



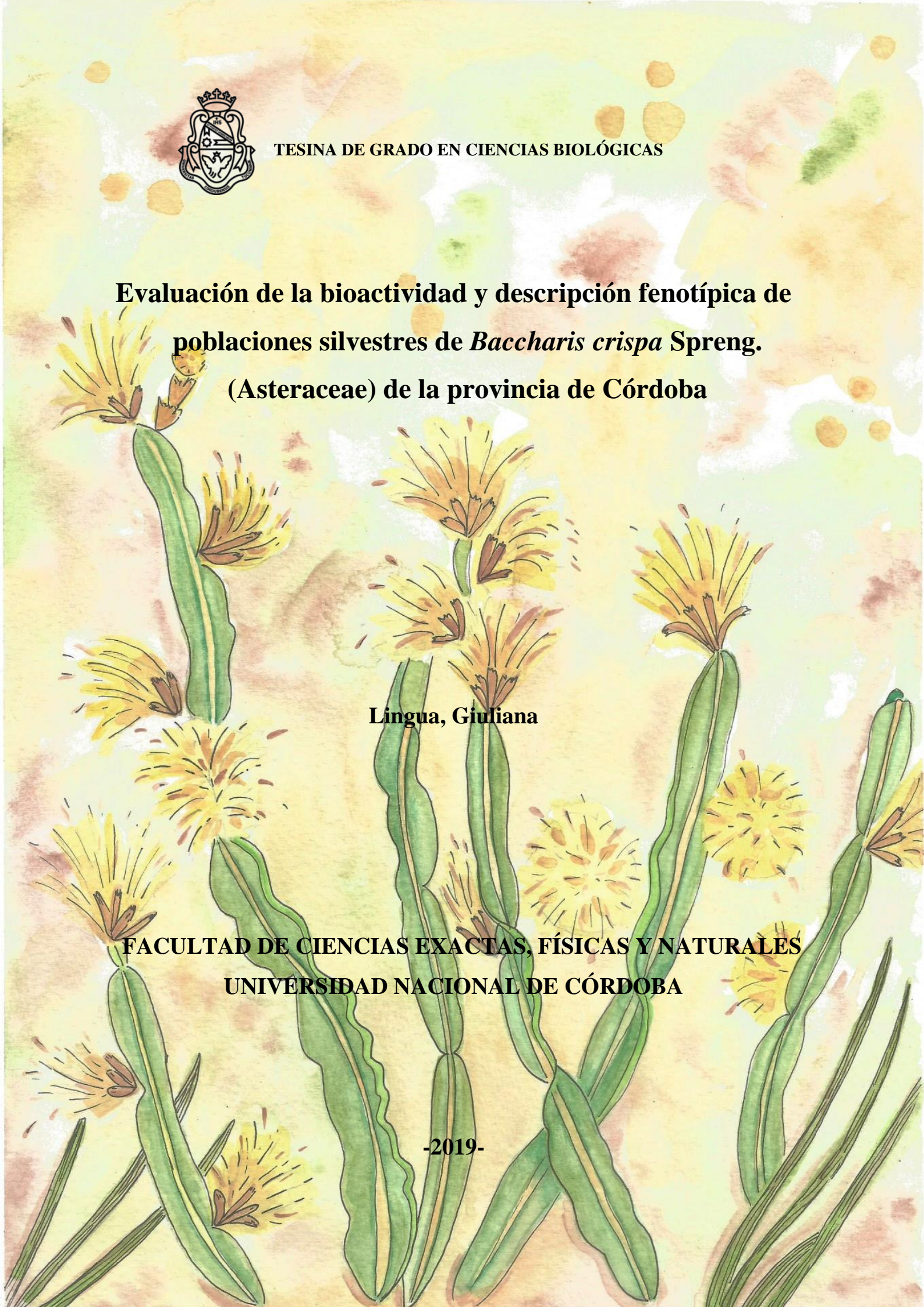
TESINA DE GRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Evaluación de la bioactividad y descripción fenotípica de poblaciones silvestres de *Baccharis crispa* Spreng. (Asteraceae) de la provincia de Córdoba

Lingua, Giuliana

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

-2019-



**Evaluación de la bioactividad y descripción fenotípica de
poblaciones silvestres de *Baccharis crisper* Spreng.
(Asteraceae) de la provincia de Córdoba**

Tesinista: Giuliana Lingua

Firma:.....

Directora: Dra. Brenda S. Konigheim

Firma:.....

Codirector: Ing. Agr. (Mgter.) Ana G. Chaves

Firma:.....

**Instituto de Virología “Dr. J. M. Vanella”- Facultad de Ciencias Médicas- UNC
Cátedra de Genética- Facultad de Ciencias Agropecuarias- UNC**

Tribunal Examinador

Dra. Ana Marisa Matesevach Becerra

Profesional Principal de Conicet/ Profesora Asistente UNC
Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV)
Museo Botánico de Córdoba- Cátedra de Morfología Vegetal (FCEFYN-UNC)

Firma:

Dr. Franco Nicolás Nazar

Investigador Asistente CONICET
Instituto de investigaciones Biológicas y Tecnológicas (IIByT. CONICET-UNC)
Prof. Asistente FCEFYN- UNC

Firma:

Dr. José Sebastián Deambolena

Cátedra de Química Orgánica- FCEFYN-UNC
Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV-CONICET)

Firma:

Calificación final:

Fecha:

Índice

Resumen	2
Abstract	3
Introducción	4
Objetivos	7
Materiales y métodos	8
A.1 Material Vegetal	8
A.2 Caracterización fenotípica, de los ambientes de crecimiento y evaluación de variabilidad	9
B.1 Obtención de los extractos	9
B.2 Bioactividad <i>in vitro</i>	11
B.3 Muestras para ensayos biológicos	11
B.4 Evaluación de la citotoxicidad	11
B.5 Cepas virales estudiadas	14
B.6 Evaluación de la actividad antiviral	15
B.7 Análisis estadístico	16
Resultados	17
Discusión	33
Conclusión	38
Proyecciones	39
Anexos	40
Bibliografía	45
Agradecimientos	52

Resumen

La búsqueda de nuevos compuestos antivirales, especialmente aquellos que provengan de fuentes naturales es una necesidad constante y actual. *Baccharis crispa* Spreng. (“carqueja”), es una especie nativa medicinal con reconocido uso popular. Según el Índice de Prioridad de Conservación, se encuentra en tercer lugar como prioritaria para su conservación debido a la creciente presión que experimentan sus poblaciones silvestres por la fuerte demanda para ser utilizada por algunas de sus atribuciones terapéuticas. Por estas razones, nos propusimos describir fenotípicamente y evaluar la variabilidad y bioactividad *in vitro* de cuatro poblaciones silvestres de *B. crispa* de la provincia de Córdoba: Villa del Parque (VP), Tala Cañada (TC), San Gerónimo (SG) y Puesto Pedernera (PP) a fin de contribuir al conocimiento de la especie para promover su utilización en la farmacología experimental, conservación y uso sostenible. Se obtuvieron extractos acuosos (EAc), clorofórmicos (ECHCl₃) y etanólicos (EEtOH) de las cuatro poblaciones. Se evaluó *in vitro*, utilizando la línea celular Vero, la citotoxicidad, capacidad virucida y actividad antiviral de los extractos frente a los virus Herpes simple tipo I y Chikungunya. La concentración citotóxica 50 (CC₅₀) de cada extracto se obtuvo con el método de captación de rojo neutro. La capacidad virucida y la actividad antiviral se evaluó utilizando la reducción de unidades formadoras de placas bajo agarosa. Se encontró variabilidad fenotípica entre las poblaciones, siendo las poblaciones de PP y VP las que mayor variabilidad presentan entre sí. Los extractos acuosos de las cuatro poblaciones resultaron menos citotóxicos que los extractos orgánicos. Estos últimos, el EEtOH de VP y el ECHCl₃ de PP, fueron los más citotóxicos (valores de CC₅₀ más bajos). De las poblaciones y extractos evaluados, la población de PP presentó la mejor capacidad antiviral y virucida, destacándose EEtOH como poco tóxico y con la mejor actividad inhibitoria frente ambos modelos virales. La población de VP fue en general inactiva, independientemente del extracto y virus evaluados. Estos datos se corresponden con los resultados de variabilidad obtenidos a nivel fenotípico. Los resultados obtenidos en esta tesina no solo amplían y profundizan las actividades antivirales descritas dentro del género, si no también son un gran aporte al estudio y conocimiento de la especie, para promover su conservación y uso sostenible.

Palabras claves: *Baccharis crispa*, bioactividades, poblaciones silvestres, variabilidad fenotípica.

Abstract

The search for new antiviral compounds, especially those that come from natural sources is a constant and current need. *Baccharis crispa* Spreng. ("Carqueja"), is a native medicinal species with popular use. According to the Conservation Priority Index, it is in third place as a priority for its conservation due to the increasing pressure that their wild populations experience due to the strong demand to be used for some of its therapeutic attributions. For these reasons, we proposed to phenotypically describe and evaluate, the variability and the *in vitro* bioactivity, of four wild populations of *B. crispa* from the province of Córdoba: Villa del Parque (VP), Tala Cañada (TC), San Gerónimo (SG) and Puesto Pedernera (PP); In order to contribute to the knowledge of the species to promote its use in experimental pharmacology, conservation and sustainable use. To do this, Aqueous (EAc), chloroform (ECHCl₃) and ethanolic (EEtOH) extracts were obtained from the four populations. The cytotoxicity, virucidal capacity and antiviral activity of the extracts, using the Vero cell line, against Herpes simplex virus type I and Chikungunya were evaluated *in vitro*. The cytotoxic concentration 50 (CC₅₀) of each extract was obtained with the neutral red uptake method. The virucidal capacity and the antiviral activity was evaluated using the reduction of plaque forming units under agarose. Phenotypic variability was found among the populations, with PP and VP populations having the greatest variability among them. The aqueous extracts of the 4 populations were the least cytotoxic. Among the organic extracts, the EEtOH of VP and the ECHCl₃ of PP were the most cytotoxic (lowest CC₅₀ values). Of the populations and extracts evaluated, the PP population presented the best antiviral and virucidal capacity, with EEtOH standing out as less toxic and with the best inhibitory activity against both viral models. The VP population was generally inactive, regardless of the extract and virus evaluated. These data correspond to the results of variability obtained at the phenotypic level. The results obtained in this work not only broaden and deepen the antiviral activities described within the genus, but they are also a great contribution to the study and knowledge of the species, to promote its conservation and sustainable use.

Keywords: *Baccharis crispa*, wild populations, phenotypical variability, bioactivities.

Introducción

En las últimas décadas, ha surgido un renovado interés por el estudio de las plantas medicinales y aromáticas asociado a la disponibilidad de nuevas técnicas de procesamiento y análisis para ensayos de materiales vegetales (Núñez & Cantero, 2000). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que el 80% de la población mundial tiene en las plantas su principal fuente de medicamentos, siendo éstas indispensables para la atención primaria de la salud (Prabuseenivasan *et al.*, 2006). Esto podría deberse principalmente a la disponibilidad y asequibilidad de las mismas, sin olvidarse del hecho que representan una fuente de diversidad química y de nuevos metabolitos secundarios bioactivos (Tagboto & Townson, 2001; Clardy & Walsh, 2004).

Particularmente en la Argentina, el 90% de la población consume al menos alguna hierba medicinal y se estima en un millar el número de especies utilizadas en el país (Chaves *et al.*, 2014). En la Provincia de Córdoba, la flora medicinal comprende un 34% de la flora total existente en ella, y un 6,3% de las plantas vasculares de Argentina, siendo la familia Asteraceae (Compuestas) la que aporta la mayor cantidad de taxones (19,34%) (Cantero *et al.*, 2006). Entre las plantas medicinales incluidas en esta familia e inscriptas como droga vegetal en la Farmacopea Argentina, se encuentran varias especies áfilas o subáfilas pertenecientes al género *Baccharis* L. conocidas bajo el nombre vulgar de “carqueja” (Del Vitto *et al.*, 2002). *Baccharis crispa* Spreng. (“carqueja”) es un subarbusto rizomatoso, dioico, de 15 a 45 cm de altura; posee ramas provistas de tres alas (de 2 a 6 mm de ancho), con hojas escamiformes y prontamente caducas (**Figura 1-2**). Las inflorescencias masculinas, miden de 4,5 a 7,5 mm de longitud; mientras que, las inflorescencias femeninas miden de 4 a 7 mm de longitud; tienen 10 aquenios glabros costados (Ariza Espinar, 1973, 2005; Cantero *et al.*, 2006; Müller, 2006).



Figura 1-2. Pies femeninos y masculinos de *Baccharis crispa*.

La distribución geográfica de esta especie abarca llanuras y sierras de Córdoba, San Luis, Catamarca, La Pampa, La Rioja, Río Negro, Chubut, San Juan, Mendoza, Buenos Aires, Santa Fe, Tucumán y Salta. También se encuentra en Uruguay, Brasil, Paraguay; probablemente en Bolivia y Perú (Ariza Espinar, 1973; Giuliano & Ariza Espinar, 1999; Giuliano, 2000). La especie es utilizada popularmente como antiséptica, antiirreumática, colagoga, diurética y hepática (Del Vitto *et al.*, 1997; Abad & Bermejo, 2007) y se encuentra inscripta como droga oficial en la Farmacopea Argentina desde el año 1966 por sus propiedades hepatoprotectoras (F.A.,1978). Entre sus principales metabolitos secundarios se han identificado flavonoides como genkwanina y 7,4'-di-O-metilapigenina (Gianello & Giordano, 1984), furanoditerpenos del tipo neoclerodanos (Tonn *et al.*, 1979), diterpenos con funcionalización butenólido (Ceñal *et al.*, 1997), y terpenos como pineno, β -cariofileno, α -cariofileno, β -cubeneno, α -elemeno y g-elemeno en la fracción volátil (Tonn & Giordano, 1980). Alguno de estos compuestos han demostrado algunas de las propiedades terapéuticas mencionadas, aunque todavía no se han determinado todos (Mangiaterra, 2005; Verdi *et al.*,2005; Lago *et al.*, 2008). Sin embargo, lo que sí se conoce, es que los principios activos dependen de factores ambientales que imperan en el lugar donde las plantas se han desarrollado (Ratera & Ratera, 1980; Del Vitto *et al.*, 2002) y de la respuesta adaptativa de distintos genotipos a su ambiente. Por esto, la calidad de un producto de origen vegetal con destino terapéutico está definida en una primera instancia por el genotipo, y posteriormente, por su interacción con el ambiente (Chaves, 2012).

Por otro lado, el mercado argentino de plantas medicinales involucra una cantidad de proveedores que mayormente basan su comercio en la actividad extractiva a partir de ambientes naturales mientras que, el aprovisionamiento a través del cultivo representa una fracción menor del mismo (Saldivia & Bandoni, 1987; Del Vitto *et al.*, 1997). Esta situación genera una marcada presión sobre los ecosistemas naturales, llegando a producirse la completa eliminación de poblaciones, con aumento de la amenaza de especies nativas cuyo equilibrio poblacional es cada vez más frágil. Martínez *et al.* (2006) han elaborado un Índice de Prioridad de Conservación (IPC) para plantas medicinales en el Valle de Paravachasca y Calamuchita de la Provincia de Córdoba, situando a *B. crispera* en tercer lugar (dentro de los subarbutos) en orden de importancia como prioritaria para su conservación.

En la actualidad existen aún patologías sin un tratamiento farmacológico efectivo ni medios para prevenirlas. Entre ellas, una de las que mayor impacto producen sobre la población son las infecciones de origen viral (Konigheim, 2012). En los últimos años, la creciente emergencia y/o re-emergencia de las mismas representa uno de los aspectos más

notorios en el campo de la salud humana. Según la OMS, en las últimas décadas han aparecido al menos 29 enfermedades nuevas que han producido la muerte de millones de personas; la mayor parte de éstas son infecciones emergentes causadas por virus (OMS, 2000).

Desde tiempos antiguos, en los que la naturaleza de los virus se desconocía, hasta su aislamiento e identificación a principios del siglo XX, éstos constituían un flagelo no sólo para el hombre, sino también para los animales, vegetales e incluso organismos unicelulares (bacterias, parásitos y hongos) (Castilla *et al.*, 2009). La palabra virus deriva del latín “*venom*” que significa veneno. Estos constituyen una organización biológica, extremadamente pequeña, infecciosa y potencialmente patógena, que parasitan células procariotas o eucariotas. Poseen una limitada capacidad codificante por carecer de maquinaria biosintética, sistema energético y ciertas enzimas, ésta situación los hace parásitos obligados de células, llamadas “células hospedadoras”. Ocasionalmente, bajo determinadas condiciones pueden permanecer en forma de infecciones persistentes, cohabitando con el hospedador que parasitan en forma silenciosa o con períodos de recurrencia activa (Castilla *et al.*, 2009). De esta manera, la persistencia o latencia de los virus son uno de los problemas más difíciles de solucionar y hasta el momento no existen soluciones alternativas (García Villalón, 2002).

Con este escenario, resulta factible inferir que las infecciones virales humanas, constituyen un problema sanitario de elevado impacto real y potencial para la Argentina y el resto del mundo. Como se mencionó anteriormente, la mayoría de estas infecciones están huérfanas de quimioterapia efectiva como así también de vacunas preventivas. En la actualidad, solamente se encuentran aprobados para el uso humano alrededor de 50 antivirales; de los cuales la mayoría son drogas para el tratamiento del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (Antonelli & Turriziani, 2012). Al bajo número de antivirales disponibles, hay que sumarle la aparición de cepas resistentes a estas drogas, que representan una seria preocupación, especialmente en pacientes inmunosuprimidos. Esta falta de terapias eficaces, ha instado a una creciente búsqueda de nuevos agentes quimioterapéuticos efectivos para el tratamiento de dichas enfermedades (Kitazato *et al.*, 2007). En este contexto, es que el estudio de plantas medicinales como potenciales agentes antivirales se presenta como un hecho de gran importancia.

Dentro del género *Baccharis*, se ha demostrado que extractos de las especies *Baccharis megapotamica*, *Baccharis uncinella* y *Baccharis articulata* presentan actividad antiviral sobre el virus Herpes Simple tipo I (HSV-I) (Montanha *et al.*, 2004; Torres *et al.*, 2011). Asimismo, extractos de *Baccharis gaudichaudiana* y *Baccharis spicata* han mostrado

actividad antiviral frente a los virus polio tipo 2 y virus de la estomatitis vesicular (Jaime *et al.*, 2013). Si bien son varias las especies del género que han sido evaluadas por su potencial capacidad antiviral, en relación a *B. crispa* solo se conoce que concentraciones subtóxicas de extractos acuosos y clorofórmicos inhiben los virus HSV-I y Encefalitis Equina Venezolana (VEEV) (Rivarola *et al.*, 2009).

Teniendo en cuenta los antecedentes presentados y considerando que el avance en el estudio de la bioactividad de la especie podría ser de gran importancia para promover la conservación de la misma, se plantean los siguientes objetivos:

Objetivo general

Evaluar la bioactividad y describir fenotípicamente poblaciones silvestres de *Baccharis crispa* de la provincia de Córdoba, a fin de contribuir al conocimiento de la especie para promover su utilización en la farmacología experimental, conservación y uso sostenible.

Objetivos específicos

- Describir fenotípicamente poblaciones silvestres de *B.crispa* de la provincia de Córdoba y su ambiente de crecimiento.
- Evaluar la variabilidad entre las poblaciones silvestres considerando los caracteres fenotípicos y los parámetros ambientales.
- Evaluar la bioactividad *in vitro* de extractos orgánicos y acuosos de diferentes poblaciones silvestres de *B. crispa*.

Materiales y métodos

A.1. Material Vegetal

El material vegetal utilizado en esta tesina fue previamente recolectado en el año 2014 de las zonas de distribución natural de la especie en la provincia de Córdoba (**Figura 3**), en el marco de la tesis doctoral de la Ing. Agr. (Mgter.) Ana Guadalupe Chaves, titulada “Bases para la domesticación y generación de una población mejorada de la especie medicinal nativa *Baccharis crispa* Spreng”. El mismo fue herborizado y depositado en el Herbario ACOR de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba (Colección LMC).

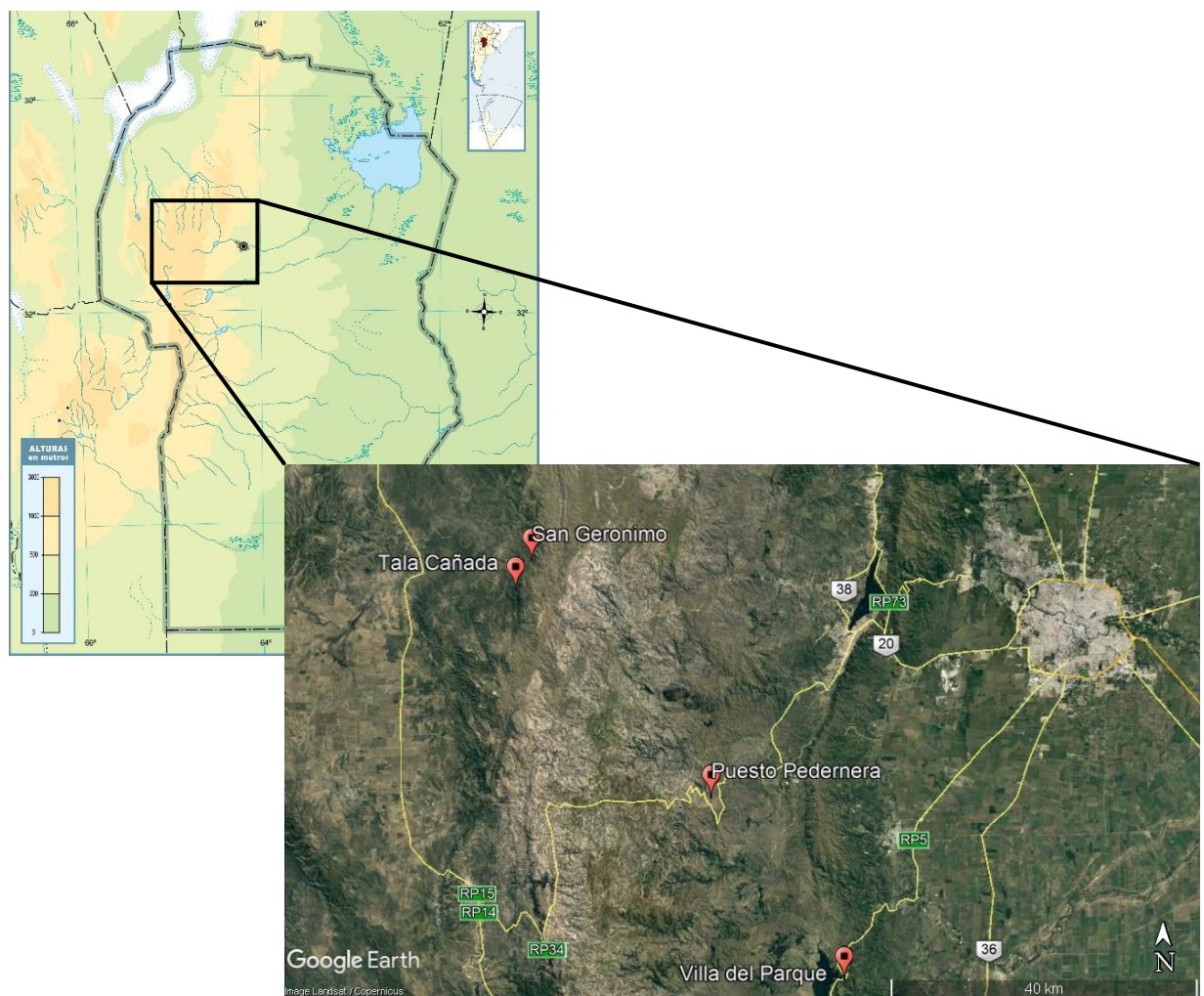


Figura 3. Sitios de muestreo de *Baccharis crispa* en la provincia de Córdoba. Fuente: Google Earth.

A.2. Caracterización fenotípica de la especie y de los ambientes de crecimiento

Los caracteres morfológicos que se utilizaron para caracterizar fenotípicamente las poblaciones fueron: altura de planta en cm (medida sobre la rama de mayor longitud); ancho de ala expresado en cm (medido desde el eje del tallo hasta el extremo del ala); longitud entrenudo (tomada como la distancia entre nudos consecutivos, medido en cm); longitud de inflorescencia femenina, expresado en cm (medida desde la base hasta el extremo de la inflorescencia); número de aquenios por capítulo (Chaves *et al.*, 2010, 2014; Chaves, 2012).

Para la caracterización del ambiente de crecimiento, en el cual se recolectó el material de cada población, se contó con registros de longitud, latitud y altitud sobre el nivel del mar; resultados del análisis físico-químico de los suelos; precipitación anual y temperatura media de los meses de enero y julio (datos tomados del Servicio Meteorológico Nacional); exposición (orientación del terreno sobre el cual crecen las plantas) y la distribución de los individuos dentro de cada población (Jaramillo & Baena, 2000) trabajando en cuadrados de 40 m de lado.

B.1. Obtención de los extractos

B.1.1. Extractos orgánicos

La elección del método extractivo depende del tipo de principios que se quieren aislar. Para la obtención de los extractos de *B. crispera*, se seleccionó un método de extracción continuo con solventes de polaridad creciente mediante la utilización de un extractor Söxhlet (Figmay) (**Figura 4**). Consiste básicamente en la maceración de una mezcla sólida (material vegetal) con un determinado disolvente, que va extrayendo los componentes más solubles. (Villar del Fresno, 1999). Los tallos y hojas de *B. crispera* una vez secos, fueron sometidos a un proceso de trituración, utilizando un molino de cuchillas con tamiz n°6 (Retsch KG 5657 HANN, Germany). El material fragmentado (40 g.) fue utilizado para obtener extractos de diferente polaridad. Antes de comenzar con la extracción el material vegetal fue sometido a una maceración con hexano para extraer grasas y clorofilas. Posteriormente se comenzó la extracción con cloroformo (CHCl₃) capaz de extraer sustancias poco polares y luego, se aumentó la polaridad utilizando etanol (EtOH), que extrae los compuestos más polares. El material vegetal estuvo en contacto con cada solvente hasta agotamiento del mismo. Una vez descartado el residuo vegetal, se procedió a la concentración de los extractos, a presión reducida y a temperaturas moderadas, entre 30-40°C, utilizando un rotavapor (Büchi R110). Todos los solventes orgánicos usados en esta tesina, fueron previamente destilados.

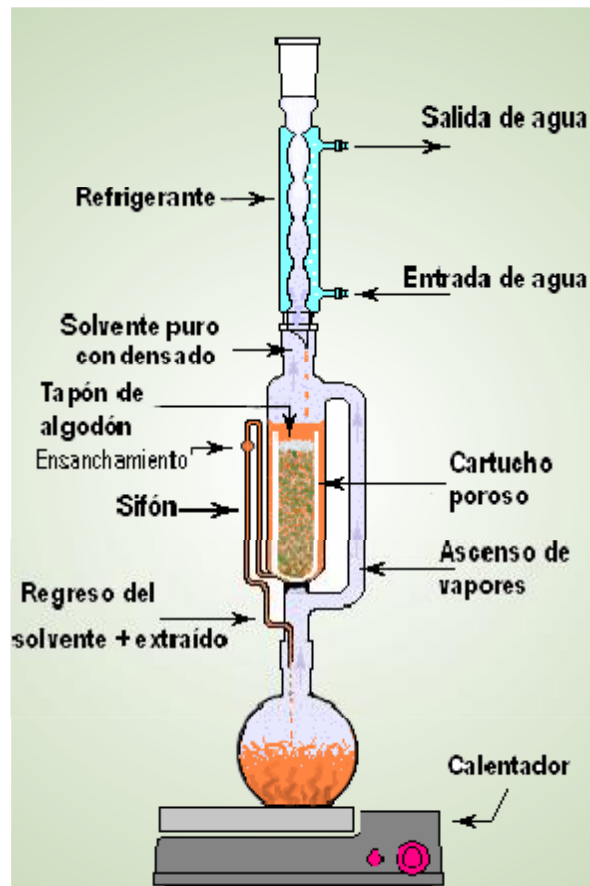


Figura 4. Esquema de un extractor Soxhlet

B.1.2. Extractos acuosos

Para la obtención del extracto acuoso caliente, se utilizó otra fracción de partes aéreas secas y molidas de *B. crista* (40 g.). Al material vegetal se le agregó cantidad suficiente de agua para cubrirlo y se calentó por una hora a 85 °C (decocción). Una vez obtenido el extracto acuoso, éste fue sometido a una liofilización (Liofilizador Labconco LYPH LOCK 6), proceso que permite la eliminación de agua mediante la congelación rápida de la muestra, seguida de la sublimación del agua, a presión reducida y temperaturas inferiores a 0°C (-50°C).

B.2. Bioactividad *in vitro*

B.2.1. Línea celular

Se emplearon cultivos de la línea celular Vero clon 76 (riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops L.*), mantenidas en estufa (Sanyo, Incu Safe MCO 17 AC) con atmosfera húmeda conteniendo 5% CO₂ a 37°C.

Para cada ensayo, se preparó una suspensión celular que contenía 2x10⁵ cel/mL, a partir de la cual se sembraron las distintas placas de cultivo.

B.2.2. Medio de Crecimiento (MC)

Medio Esencial Mínimo (MEM) con aminoácidos no esenciales modificado por Dulbecco, suplementado con 10% de suero fetal bovino, L-glutamina (3gr/L) y sulfato de gentamicina (50µg/mL) como antibiótico.

B.2.3. Medio de Mantenimiento (MM)

MEM con aminoácidos no esenciales modificado por Dulbecco, suplementado con 2% de SFB, 1% L-glutamina y 50 µg/mL de ATB.

B.3. Muestras para ensayos biológicos

Se prepararon soluciones stock en dimetil sulfóxido (DMSO) de cada extracto obtenido, en una concentración de 100 mg/mL. Las diluciones preparadas a partir de estas soluciones madres se realizaron con MM.

B.4. Evaluación de la citotoxicidad

En la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos a partir de productos naturales, la evaluación de la seguridad es de suma importancia. En la actualidad, la toxicología cuenta con una gran variedad de bioensayos que pueden utilizarse para estudiar la seguridad biológica de biomateriales (Fernandes *et al.*, 2005), tales como extractos, fracciones o compuestos puros obtenidos de especies vegetales.

Dentro de la batería de ensayos *in vitro*, que se utilizan para evaluar la toxicidad aguda de una sustancia dada, se encuentran los llamados ensayos de citotoxicidad, que utilizan cultivos celulares primarios o líneas celulares establecidas. La citotoxicidad celular se define como una alteración en la estructura y/o funciones celulares básicas que lleva a la producción de un daño que puede ser detectado a través de la proliferación y/o supervivencia celular (Repetto, 2002).

El valor predictivo de los estudios de citotoxicidad se basa en la idea que cuando se afectan funciones celulares básicas y, comunes a todas las células, la determinación del daño celular es una medida aproximada de la toxicidad general del compuesto (Repetto, 2002)

La evaluación de la citotoxicidad comprendió dos etapas: una cualitativa preliminar de observación de efectos citopáticos y una cuantitativa de determinación de la viabilidad celular.

B.4.1. Observación del efecto citopático (ECP): *screening* preliminar

Mediante esta metodología, se observan por microscopía óptica los cambios que producen los productos sobre la morfología de las células (Riva & López, 1993). Estos cambios morfológicos se definen como efectos citopáticos e incluyen:

- _ Cambios de la estructura celular (efectos sobre el tamaño y la forma).
- _ Cambios en la estructura del cultivo celular.
- _ Lisis celular.
- _ Efectos sobre el citoesqueleto.
- _ Pérdida de agregación al sustrato.
- _ Lesiones nucleares.
- _ Cambios en la estructura y propiedades de la membrana citoplasmática.

Este *screening* preliminar es una medida cualitativa de la citotoxicidad, que permite apreciar las concentraciones que comienzan a ser nocivas. Para ello, monocapas de células Vero preformadas de 48 h y crecidas en placa de 24 pocillos, se incubaron por duplicado con 1ml de MM conteniendo diferentes concentraciones de los extractos (1, 10, 100 y 1000µg/mL) realizadas a partir de las soluciones stocks (100mg/mL). Se dejaron en cada caso controles celulares (CCe), los que fueron incubados con MM solo. Las células fueron observadas, mediante microscopio óptico invertido, durante tres días consecutivos, para detectar la aparición de cualquier alteración en la morfología. Considerando citotóxicas aquellas concentraciones que mostraron al microscopio óptico alteraciones morfológicas como redondeamiento, retracción de la membrana o presencia de gránulos en el citoplasma visibles (Ooi *et al.*, 2004), se determinó la máxima concentración para cada uno de los extractos que no produce efecto citopático.

B.4.2. Evaluación de la viabilidad celular (VC)

Los ensayos que evalúan la viabilidad celular, se utilizan para estudiar la toxicidad aguda, evaluación de respuestas inmediatas o de corto plazo, donde la utilización de métodos colorimétricos son los más empleados (Riva & López, 1993).

Los ensayos colorimétricos miden la viabilidad de las células mediante la captación o formación de un colorante por parte de alguna organela celular que permanece funcional, luego de la exposición a una sustancia; de esta manera la pérdida de viabilidad indica efectos intracelulares nocivos por parte del compuesto, que suceden con anterioridad a cualquier daño que pueda producir en la membrana celular.

El método de captación de Rojo Neutro (RN), propuesto por Borenfreud & Puerner (1985), es uno de los ensayos colorimétricos más empleados para medir citotoxicidad. Está basado en la capacidad de las células viables de incorporar el RN como marcador supravital. Este colorante catiónico penetra las membranas celulares por difusión pasiva, concentrándose en organelas con membrana (lisosomas y endosomas). En consecuencia, la cantidad de colorante retenido es proporcional al número de células viables (Repetto *et al.*, 2008). Se siguió entonces este protocolo realizándole algunas modificaciones.

Se utilizó una placa de cultivo de 96 pocillos con células Vero. A las 24 hs, se eliminó el medio de crecimiento (MC) y se le agregó MM nuevo conteniendo 15 concentraciones diferentes (por triplicado) de cada extracto, incluidas en el rango de concentraciones no citotóxicas obtenido en el *screening* preliminar. Se dejaron cultivos de células con MM solo, como CCe. Al cabo de 72 hs de incubación, el medio fue removido y se agregó durante 3 hs, una solución de RN (50 µg/mL en MEM). Posteriormente, se extrajo el colorante contenido en los lisosomas y endosomas de las células viables con una solución de agua - etanol - ácido acético (50:49:1), durante 15 min. en agitación continua. La densidad óptica (DO) del colorante extraído se obtuvo mediante un lector de microplacas (BioTek ELx800) realizando las lecturas a 540 nm. Los porcentajes de viabilidad celular se determinaron en base a los valores obtenidos de los CCe, tomados como 100 % de viabilidad, utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición (\% I)} = (D.O(t)/D.O(c) \times 100)$$

- D.O (t), densidad óptica del cultivo tratado.
- D.O (c), densidad óptica del cultivo control.

Con los valores obtenidos con esta fórmula, se confeccionaron curvas de viabilidad, en las cuales se graficaron los logaritmos de las concentraciones de los extractos ($\mu\text{g/mL}$) vs. porcentaje de viabilidad celular (% VC). A partir de estos gráficos se determinaron los valores de concentración que provocan daño celular evidente al 50 % y al 20% de los cultivos tratados, es decir la concentración citotóxica media (CC_{50}) y la concentración subtóxica (CC_{80}). La obtención de estos valores nos permitió posteriormente emplear intervalos de concentración no-tóxicos o sub-tóxicos en los ensayos de actividad antiviral.

B.5. Cepas virales estudiadas

Se eligieron como modelos virales de experimentación, virus que están totalmente caracterizados y son de uso corriente en investigación en el laboratorio de Arbovirus del Instituto de Virología Dr. J. M. Vanella (InViV, FCM-UNC). Así, han sido seleccionados como sistemas virales modelos: **A**) virus ARN: **Chikungunya** (CHIKV) (Alfavirus-Arbovirus) genotipo Asiático-americano y **B**) virus ADN: **Herpes simple tipo 1** (HSV-1) (Herpesvirus) cepa KOS.

B.5.1. Determinación del título del stock viral.

Algunos virus son capaces de formar placas de lisis cuando se multiplican en determinados sistemas de cultivo, recubiertos por un medio semisólido. Aquí, la difusión de las partículas virales formadas de *novo* es muy limitada debido a la consistencia semisólida del medio de cultivo, por lo tanto, la infección está restringida a las células vecinas que abandonó la partícula infectante. Esto provoca la formación de una zona de lisis celular masiva, denominada placa de lisis, visible a simple vista. De esta manera cada placa se considera iniciada por una partícula viral (Del Barrio Alonso *et al.*, 2008).

Aprovechando que los virus seleccionados para la elaboración de esta tesina son capaces de producir placas de lisis, la titulación de los stocks de los mismos se realizó utilizando la técnica de unidades formadoras de placas (UFP) bajo agarosa en células Vero (Earley *et al.*, 1967).

Para cada virus, una monocapa confluyente de células Vero fue infectada con 100 μl de cada dilución seriada (factor 10) realizada a partir del stock viral (por triplicado) e incubada durante 1h a 37°C con atmósfera húmeda conteniendo 5% CO_2 . Transcurrida la etapa de absorción, se cubrió la monocapa con una solución semisólida constituida por partes iguales de agarosa al 1% y MC de doble concentración. Cuando esta capa se solidificó, las células se mantuvieron en estufa con atmósfera húmeda conteniendo 5% CO_2

a 37°C durante 3 días para HSV-I y 2 días para CHIKV. Esta lectura final se realizó el día en el cual no aparecen nuevas UFP.

El título viral se expresa como el número de UFP presentes en la dilución anterior a donde ya no hay placa, por el logaritmo de dicha dilución. A partir de cada stock se calcularon las diluciones correspondientes para tener 100 UFP en los ensayos posteriores.

B.6. Evaluación de la actividad antiviral

La determinación de la actividad antiviral de un producto o compuesto consiste en la evaluación de su capacidad de reducir o anular la multiplicación viral en los sistemas empleados.

B.6.1. Screening de actividad antiviral *in vitro*

El objetivo de este ensayo, fue evaluar de manera general si los extractos, poseían la capacidad de actuar sobre alguno de los modelos virales en estudio. En este sentido, la actividad antiviral de un producto puede ser medida mediante su capacidad para reducir el número de UFP, con respecto al control (Del Barrio Alonso *et al.*, 2008).

Para ello, células Vero fueron sembradas en placas de cultivo de 24 pocillos y se incubaron durante 48 hs hasta alcanzar el 95% de confluencia. El medio fue descartado y la monocapa celular infectada con 100 UFP de cada modelo viral. Luego de 1 h de incubación a 37°C con atmosfera del 5% de CO₂, se lavó con una solución salina de fosfatos estéril (PBS) para eliminar las partículas virales que no fueron capaces de adherirse a la membrana celular y se cubrió la monocapa con medio semisólido constituido por partes iguales de agarosa al 1% y MC de doble concentración, conteniendo dosis decrecientes a partir de la CC₈₀ de cada extracto a evaluar, por triplicado. Se incluyeron: controles virales (CV: células infectadas sin tratar), control de extractos (Cext: células tratadas a la máxima concentración (CC₈₀) y sin infectar), controles celulares (CCe: células sin infectar y sin tratar) (n=3). Seguidamente las células se incubaron a 37°C con atmósfera del 5% de CO₂ durante 2 ó 3 días, dependiendo del modelo viral.

Posteriormente, las monocapas de células se fijaron con formol al 10% durante 2 horas y las placas de lisis se revelaron con una solución de cristal violeta al 1%. De esta manera, el número de placas fue cuantificado y obtenido el porcentaje de inhibición (% I) de cada extracto en base a los valores obtenidos en los controles virales (CV) (100%).

B.6.2. Evaluación de la acción virucida

El objetivo de este ensayo fue determinar si los extractos tienen capacidad para inactivar las partículas virales antes que las mismas ingresen a la célula hospedadora (capacidad virucida).

La acción inactivante directa de un producto sobre las partículas virales puede ser evaluada mediante el tratamiento de suspensiones virales de título conocido. El efecto virucida conlleva una disminución brusca en el título infectivo residual de la suspensión con respecto a los controles no tratados (Del Barrio & Parra, 2000; Fernández Romero *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2005; Del Barrio Alonso *et al.*, 2008).

Se determinó el efecto directo de cada extracto para inactivar las partículas virales, utilizando la prueba de reducción de UFP bajo agarosa en células Vero. Para ello, se mezclaron 100 μ l del stock de cada modelo viral con 100 μ l de una concentración de extracto que corresponde a su CC_{50} . Esta mezcla se incubó 1h a 37°C. Posteriormente, a partir de cada mezcla se realizaron diluciones seriadas (factor 10) y cada dilución fue agregada por duplicado sobre una capa confluyente de células y tras 1 h de incubación a 37°C con atmosfera húmeda de 5% CO_2 para permitir el ingreso del virus a la célula hospedadora (absorción viral), se agregó una solución semisólida constituida por partes iguales de agarosa al 1% y MC de doble concentración. Luego del período de incubación necesario para cada virus, las células fueron fijadas con formol al 10% durante 2 horas y las placas de lisis se revelaron con una solución de cristal violeta al 1%. Se cuantificó número de placas y se obtuvo la reducción de UFP en base a los valores obtenidos en los CV.

B.7. Análisis estadístico

Para la caracterización fenotípica se empleó estadística descriptiva, y para evaluar la variabilidad, se realizaron análisis de la varianza (ANAVA) y de componentes principales (ACP). Para determinar la significancia estadística se aplicó la prueba a posteriori DGC con un α de 0,05.

Para los análisis de bioactividad se evaluó si existían diferencias significativas entre las medias poblacionales y entre los extractos mediante análisis de la varianza (ANAVA). La significancia estadística se determinó también mediante la prueba a posteriori DGC con un α de 0,05. Para la realización de todos los análisis estadísticos antes mencionados se utilizó el software estadístico *Infostat* (Di Rienzo *et al.*, 2018).

Resultados

A. Caracterización fenotípica, de los ambientes de crecimiento y evaluación de la variabilidad

A.1 Caracterización fenotípica de las poblaciones muestreadas

Del estudio de las variables morfológicas, medidas en los individuos muestreados en cada población, se observó la existencia de diferencias significativas entre las poblaciones (DGC, $gl=39$; $p\leq 0,05$) para los caracteres morfológicos evaluados (altura, ancho de ala, longitud de entrenudo, longitud de inflorescencia femenina y n° de aquenios/capítulo).

En la **Figura 5** se presentan los valores medios del carácter altura (cm) de planta para cada población y las diferencias encontradas con su significancia estadística. La población de Puesto Pedernera difiere ($p\leq 0,05$) de las restantes poblaciones para el carácter altura de planta, presentando el valor medio más bajo (20,5 cm), mientras que las poblaciones de Villa del Parque, San Gerónimo y Tala Cañada presentan un promedio de altura superior a los 24 cm.

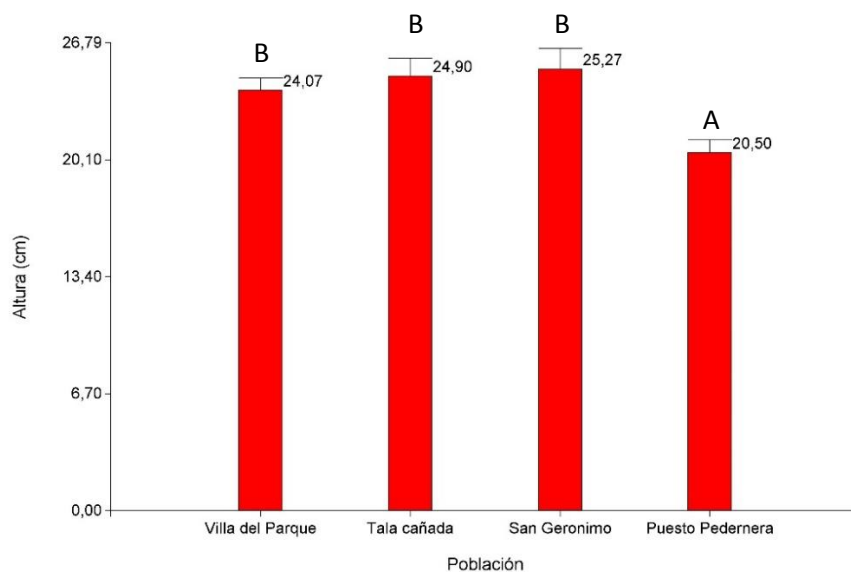


Figura 5. Valores medios para el carácter altura de planta (cm) de cada una de las poblaciones silvestres evaluadas de *Baccharis crispa* ($n=40$). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (DGC, $gl= 39$; $p\leq 0,05$)

En la **Figura 6** se presentan los valores medios del carácter ancho de ala (cm) medidos para cada población. Aquí se observa que la población de Villa del Parque difiere ($p\leq 0,05$) significativamente de las otras tres poblaciones. Dicha población presenta un valor medio de 0,15 cm, mientras que las poblaciones restantes presentan un valor superior a 0,2 cm no difiriendo entre ellas.

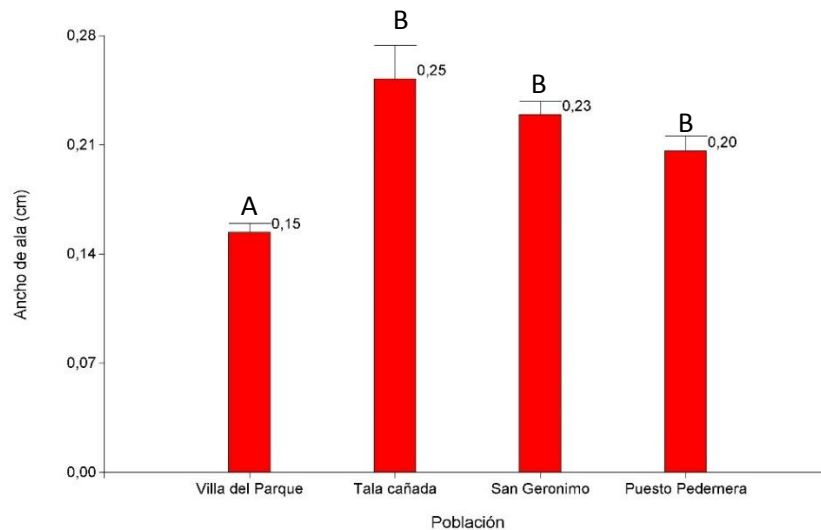


Figura 6. Valores medios para el carácter ancho de ala (cm) en cada una de las poblaciones silvestres de *Baccharis crispa* (n=40). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (DGC, gl=39; $p \leq 0,05$)

En la **Figura 7** se muestran los valores medios del carácter longitud de entrenudo (cm) medidos por población. De acuerdo a lo observado en el gráfico, Puesto Pedernera difiere ($p \leq 0,05$) de las restantes poblaciones para ese carácter. Siendo esta la que presenta menor valor de longitud de entrenudo (1,06 cm), mientras que San Gerónimo tiene un valor promedio de 1,26 cm, Villa del Parque 1,28 cm y 1,32 cm para Tala Cañada.

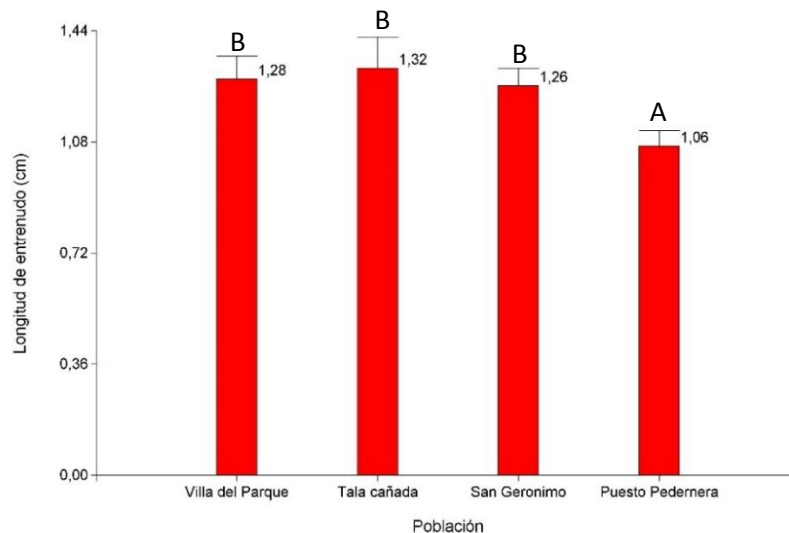


Figura 7. Valores medios para el carácter longitud de entrenudo (cm) en cada una de las poblaciones silvestres de *Baccharis crispa* (n=40). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (DGC, gl=39; $p \leq 0,05$)

El carácter longitud de inflorescencia femenina (**Figura 8**) también presentó diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre las poblaciones. Así se puede observar que la población de Villa del Parque es la que presenta inflorescencias femeninas de menor longitud (0,81 cm) con respecto a las tres poblaciones restantes.

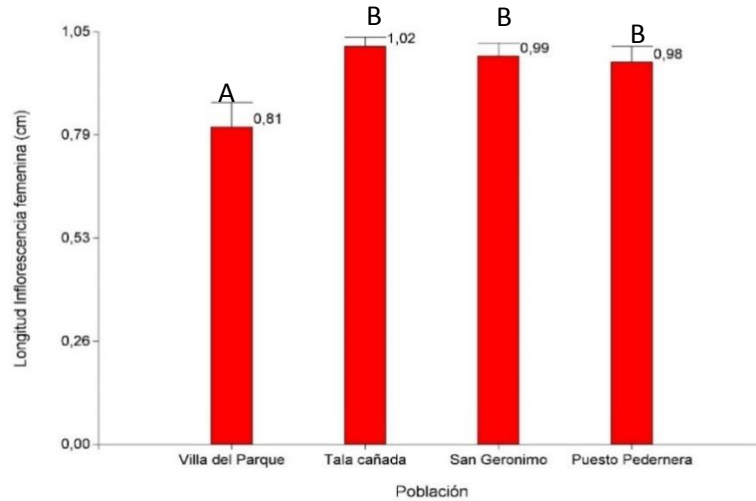


Figura 8. Valores medios para el carácter longitud de inflorescencia femenina (cm) en cada una de las poblaciones silvestres de *Baccharis crisper* (n=40). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (DGC, gl=39; $p \leq 0,05$)

Del análisis estadístico realizado con los valores medios del carácter número de aquenios por capítulo (**Figura 9**), se observa que las poblaciones de Tala Cañada y Puesto Pedernera son iguales y difieren ($p \leq 0,05$) de las poblaciones Villa del Parque y San Gerónimo que a su vez son distintas entre ellas en sus valores medios para ese carácter. Mientras que Villa del Parque presenta el menor número de aquenios por capítulo en promedio (53), San Gerónimo es la que posee el mayor número de aquenios por capítulo (81).

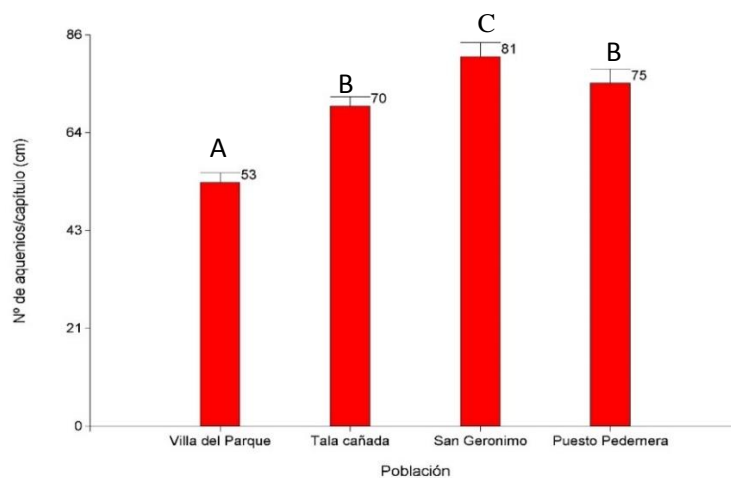


Figura 9. Valores medios para el carácter número de aquenios por capítulo en cada una de las poblaciones silvestres de *Baccharis crisper* (n=40). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (DGC, gl=39; $p \leq 0,05$)

A.2 Caracterización de los ambientes de crecimiento

Para realizar la caracterización de los ambientes de crecimiento, se localizaron geográficamente cuatro poblaciones silvestres de *B. crista* en la zona serrana de la provincia de Córdoba (**Tabla 1**) (**Ver Figura 3**).

Tabla 1. Ubicación geográfica (altitud, latitud y longitud) de las cuatro poblaciones silvestres de *B. crista* evaluadas, de la provincia de Córdoba.

Población	Altitud	Latitud	Longitud
Villa del Parque	827 msm	31°49'14,7'' S	64°30'17,8''O
Puesto Pedernera	1509 msm	31°36'20,3''S	64°41'14,1''O
Tala Cañada	1347 msm	31°22'01,14''S	64°57'10,8''O
San Gerónimo	1463 msm	31°20'01,4''S	64°55'50,5''O

La descripción de los parámetros climatológicos de los lugares muestreados se realizó con información correspondiente a la base de datos del Servicio Meteorológico Nacional (SMN, s.f.). Se recurrió a esta base, debido a la imposibilidad de contar con una estación meteorológica en cada sitio de muestreo para obtener los datos de las variables climáticas.

En la **Tabla 2** se presentan los valores de las variables climáticas temperatura media (meses de enero y julio) y precipitación media anual de las poblaciones muestreadas.

Tabla 2. Datos de temperatura media y precipitaciones de las áreas de muestreo

Población	Departamento	A	B	PPMA
Villa del Parque	Santa María	29°/18°	18°/4°	141
Puesto Pedernera	Punilla	32°/18°	18°/5°	121,1
Tala Cañada	Pocho	32°/18°	18° /5°	121,1
San Gerónimo	Pocho	32°/18°	18°/ 5°	121,1

A: Temperatura máxima y mínima media del mes enero (°C). B: Temperatura máxima y mínima media del mes de julio (°C). PPMA: Precipitación media anual (mm).

Para la descripción de las características edáficas de los sitios de muestreo, se eligieron variables que en trabajos anteriores permitieron identificar las poblaciones muestreadas (Chaves, 2012; Chaves *et al.*, 2014). Los resultados de estos análisis se presentan divididos en químicos y físicos (**Tablas 3 y 4**)

Tabla 3. Análisis químico del suelo de los sitios de muestreo de las poblaciones de *B. crispera* evaluadas.

Población	MO	C	pH	CE
Villa del parque	12,41	7,20	6,3	0,4
Puesto Pedernera	8,11	4,70	5,7	0,4
Tala Cañada	8,90	5,16	6,0	0,6
San Gerónimo	7,31	4,24	6,0	0,5

MO: Materia Orgánica (%); C: Carbono Orgánico (%); CE: Conductividad eléctrica (dS/m)

Considerando los resultados del análisis químico, se puede observar como los suelos de los cuatro sitios muestreados presentan porcentajes por encima del valor medio de materia orgánica (5,8%) y carbono (3%) reportados para esta ecorregión (Wilson, 2017). De las poblaciones evaluadas se destaca principalmente la población de Villa del Parque con los valores más altos. El pH por otro lado, corresponde al de suelos levemente ácidos. Sin embargo, los valores de conductividad eléctrica (<2 ds/m) indican que los efectos de la salinidad son despreciables (Bachmeier *et al.*, 2018).

Tabla 4. Análisis físico del suelo de los sitios de muestreo de las poblaciones de *B. crispera* evaluadas.

Población	Arena muy gruesa (%)	Arena media (%)	Arena muy fina (%)	Limo (%)	Arcilla (%)
Villa del Parque	4,1	20,1	10,1	25,6	9,0
Puesto Pedernera	11,9	48,1	0,1	1,4	6,6
Tala Cañada	20,5	24,5	0,0	16,8	10,8
San Gerónimo	6,5	27	6,6	18,8	10,0

Al analizar los resultados del análisis físico, se puede observar que los cuatro sitios de crecimiento presentan una composición granulométrica predominante de partículas gruesas (arena media). Estos resultados permitieron clasificar texturalmente los suelos de cada población siguiendo el sistema de clasificación del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) (**Tabla 5**).

Tabla 5. Clasificación textural de los suelos de cada una de las poblaciones silvestres de *B. crispera* evaluadas siguiendo el sistema clasificatorio USDA.

Población	Clase Textural
Villa del Parque	Franco Arenoso
Puesto Pedernera	Arenoso
Tala Cañada	Franco Arenoso
San Gerónimo	Franco Arenoso

En cuanto a la exposición y distribución de los individuos dentro de cada población, todas las poblaciones muestreadas se encontraron en las laderas sur de las lomas, con un mismo patrón de distribución en el terreno: los pies femeninos con una distribución agregada y los masculinos distribuidos aleatoriamente en el terreno. A su vez, los grupos con pies femeninos fueron más numerosos en plantas que los de pies masculinos, en contrapartida considerando un cuadrado de 40 m de lado, la cantidad de pies masculinos era mayor que los de pies femeninos en cada población (**Figura 10 A-C**).

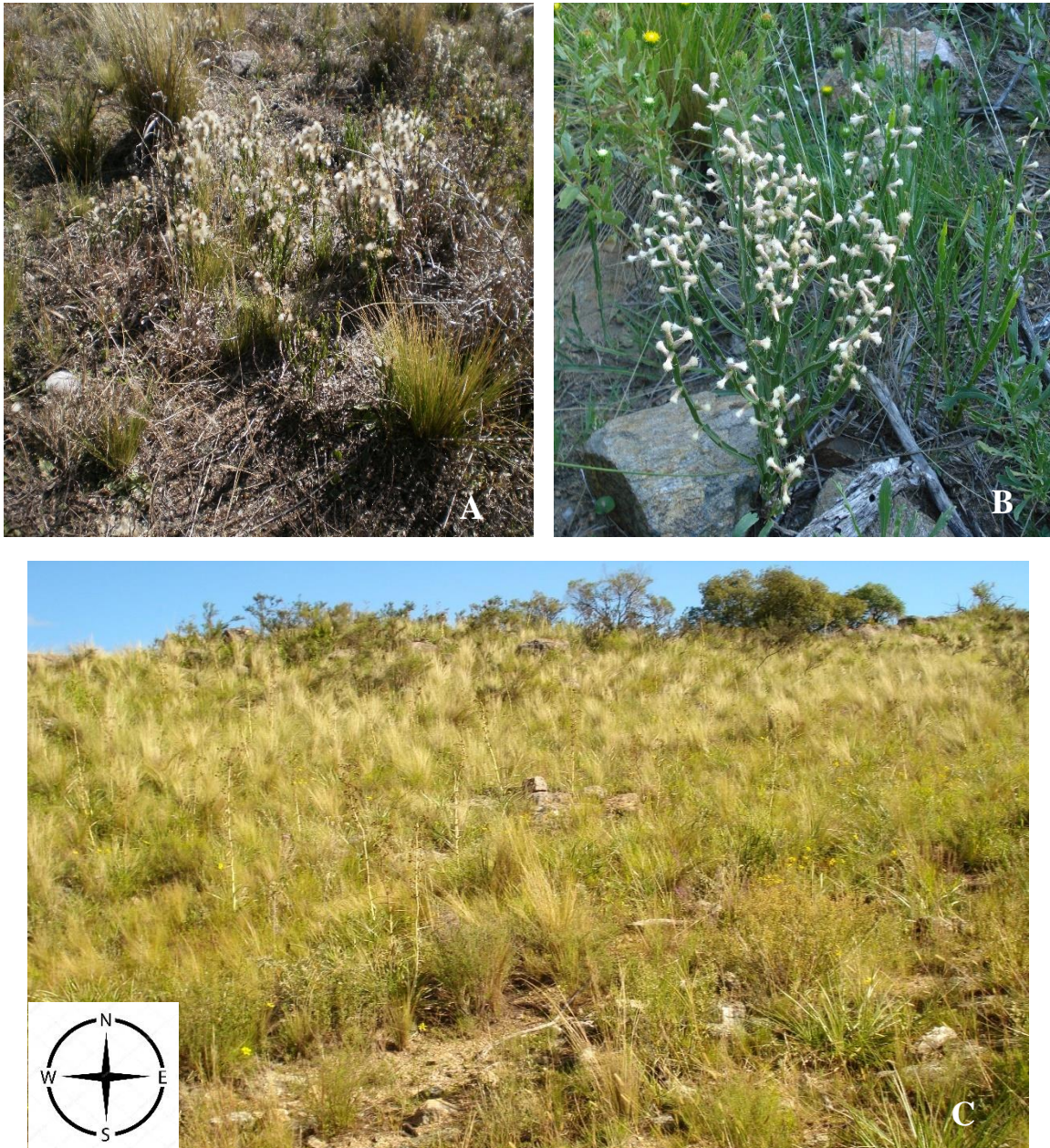


Figura 10. (A) Pies femeninos y masculinos en floración. (B) *En* su hábitat de crecimiento natural (pie femenino). (C) Orientación típica en el terreno

A.3 Evaluación de la existencia de variabilidad a través de caracteres morfológicos y variables ambientales de los sitios de crecimiento

En los trabajos de caracterización de poblaciones es importante evaluar la existencia de variabilidad entre las poblaciones que están siendo estudiadas. Entre las herramientas estadísticas multivariadas con las que se cuenta para realizar la caracterización y evaluación de la variabilidad, el análisis de componentes principales (ACP) permite obtener una representación gráfica óptima de la variabilidad de los datos que se están analizando (Di Rienzo *et al.*, 2018).

De esta manera, a través del ACP, incluyendo como variables los caracteres morfológicos (altura, longitud de entrenudo, ancho de ala, longitud de inflorescencia femenina y el número de aquenios/capítulo) y las variables ambientales de los sitios de crecimiento (pH, materia orgánica, carbono, conductividad eléctrica, tipos de arena, limo y arcilla), se encontró variabilidad entre las poblaciones estudiadas (**Figura 11**). El 90,3% de la variabilidad fenotípica existente, puede ser explicada con los dos primeros componentes principales que forman el plano del Biplot. Entre Villa del Parque y Puesto Pedernera, se presenta la mayor distancia de Biplot, lo que indica que entre estas poblaciones existe la mayor variabilidad para las variables consideradas en el análisis. Considerando el primer componente (CP1) que explica el 54,5% de la variabilidad total, es posible diferenciar al menos tres grupos de poblaciones: Villa del Parque, Puesto Pedernera y (Tala Cañada + San Gerónimo). Villa del Parque se encuentra asociada a las variables ambientales: carbono y materia orgánica, arena muy fina, Limo y pH; y a los caracteres morfológicos: altura y longitud de entrenudo. A su vez, estos dos caracteres se relacionan entre sí de manera positiva.

Por otra parte, el segundo componente principal (CP2) permite diferenciar a las poblaciones de Tala Cañada y San Gerónimo de las otras dos poblaciones. Dichas poblaciones (Tala Cañada y San Gerónimo) aparecen altamente relacionadas entre sí y asociadas a las variables ambientales: conductividad eléctrica y contenido de arcilla; y a los caracteres morfológicos: ancho de ala, altura y longitud de entrenudo.

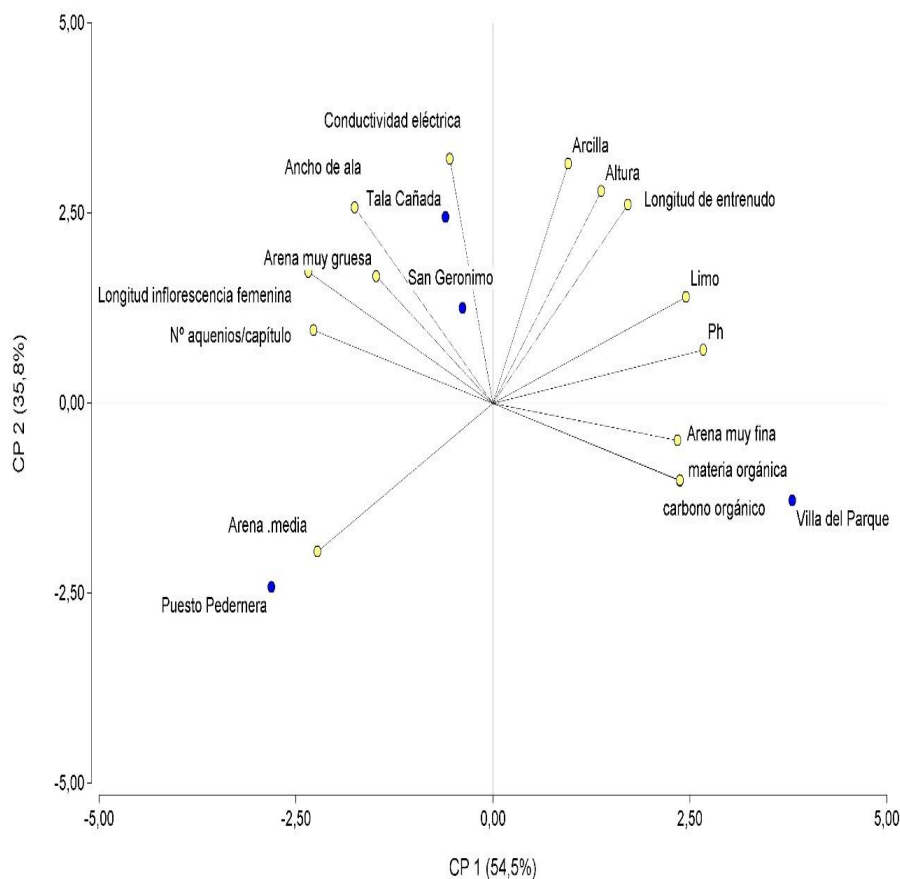


Figura 11. Variabilidad de cuatro poblaciones silvestres de *B. crispa*, según los dos primeros componentes del Análisis de Componentes Principales basado en caracteres morfológicos y variables ambientales.

B. Bioactividad *in vitro*

B.1 Ensayo de citotoxicidad

B.1.1. Observación del efecto citopático (ECP).

En una primera etapa, se observó diariamente (durante 72 h) el efecto citopático (ECP) que producía cada extracto a cuatro concentraciones diferentes (1, 10, 100 y 1000 $\mu\text{g/mL}$) sobre una monocapa de células Vero. Los extractos generaron diferentes tipos de ECP, siendo el grado de afección dependiente de la concentración para todos los casos (**Tabla 6**). En base a los resultados observados, se puede generalizar que los extractos etanólicos (EEtOH) y clorofórmicos (ECHCl₃) fueron los primeros producir alteraciones sobre las células (24 h); mientras que los extractos acuosos (EAc) recién comenzaron a provocar cambios a partir de las 48 h. En general, a las 72 h todas aquellas concentraciones que ya habían sido tóxicas, desprendieron completamente las monocapas.

Tabla 6. Efectos citopáticos (ECP) producidos por los extractos sobre monocapas de células Vero, observados a las 24 y 48 h post-inoculación.

Extractos	Observaciones	
	24 h	48 h
ECHCl₃	Redondeamiento celular	Desprendimiento parcial de la monocapa
EEtOH	Retracción de las membranas	Desprendimiento parcial de la monocapa
EAc	Sin efecto aparente	Redondeamiento celular

En la **Figura 12** se muestran los efectos citopáticos (**ECP**) observados, respecto a una monocapa control la cual sólo contenía medio de mantenimiento (**Figura 12-D**). La **Figura 12-A** muestra el plegamiento de la monocapa de células sobre si misma debido a la pérdida de adhesión al sustrato; la retracción de la membrana se observa en la **Figura 12-B**, en tanto que, el redondeamiento de las células se muestra en la **Figura 12-C**.

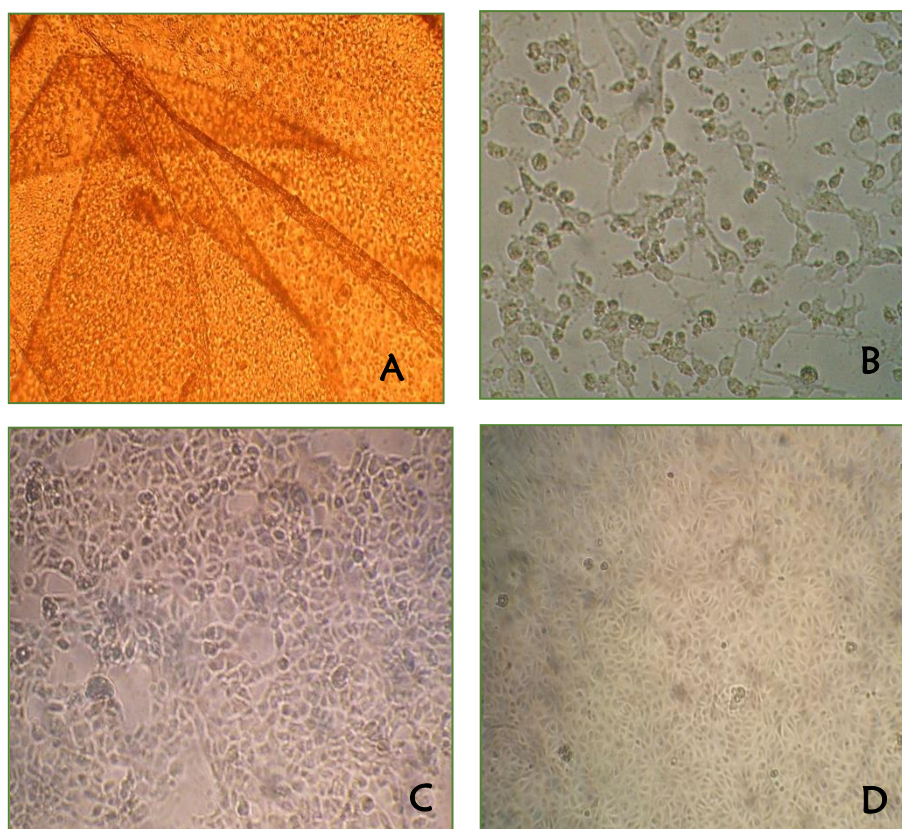


Figura 12. ECP observados sobre células Vero, sometidas a una concentración tóxica de los extractos. **Figura A:** Plegamiento y desprendimiento parcial de la monocapa celular producido por los extractos EEtOH. **Figura B:** Retracción de las membranas celulares generado por los extractos ECHCl₃. **Figura C:** Redondeamiento celular observado para los extracto EAc. **Figura D:** Control celular (40 X).

En una segunda etapa se determinaron los intervalos de concentraciones obtenidos en el *screening* preliminar correspondiente a cada extracto, en donde el efecto sobre las células oscila entre tóxica y no tóxica. Estos intervalos surgen de la observación microscópica de la aparición de cambios morfológicos obtenidos a las 72 h post-tratamiento con los extractos (Tabla 7).

Tabla 7. Intervalos de concentraciones obtenidos en el *screening* preliminar correspondientes a cada extracto y población, donde el efecto sobre las células oscila entre tóxica y no tóxica.

Población	Extractos	Intervalo de concentración (µg/mL)
Villa del Parque	ECHCl ₃	1000 - 90
	EEtOH	1000 - 25
	EAc	1000 - 500
Tala Cañada	ECHCl ₃	1000 - 50
	EEtOH	1000 - 200
	EAc	1000 - 500
San Gerónimo	ECHCl ₃	1000 - 100
	EEtOH	1000 - 100
	EAc	1000 - 300
Puesto Pedernera	ECHCl ₃	1000 - 50
	EEtOH	1000 - 500
	EAc	1000 - 600

B.1.2 Evaluación de la viabilidad celular (VC)

A partir de los resultados que se muestran en la **Tabla 7**, se realizaron las curvas de viabilidad celular a fin de cuantificar la misma y determinar el valor de concentración que provoca daño celular al 50 % de las células Vero tratadas (Concentración Citotóxica media, **CC₅₀**) y el que provoca un 20% de daño celular (Concentración Citotóxica 80 o subtóxica **CC₈₀**)

Las curvas de viabilidad celular obtenidas mediante el método colorimétrico de captación de **RN** para cada extracto de cada población, se muestran en el **Anexo I**. A partir de dichas curvas, se estimaron mediante regresión, los valores de **CC₅₀** y **CC₈₀** (**Tabla 8**)

Tabla 8. Valores de concentración citotóxica 50 % (CC_{50}) y de CC_{80} de cada extracto sobre la línea celular Vero, obtenidos por el método colorimétrico de captación de RN (método cuantitativo) y valores de citotoxicidad obtenidos mediante observación del ECP (método cualitativo).

Población	Extractos	CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	CC_{80} ($\mu\text{g/mL}$)	ECP ($\mu\text{g/mL}$)
Villa del Parque	ECHCl ₃	326,17 \pm 6,7	134,94 \pm 5,6	90
	EEtOH	92,99 \pm 3,5	20,18 \pm 1,1	25
	EAc	700,42 \pm 17,3	482 \pm 11,4	500
Tala Cañada	ECHCl ₃	109,27 \pm 4,6	52,53 \pm 2,6	50
	EEtOH	413,46 \pm 19,5	219,81 \pm 5,4	200
	EAc	611,96 \pm 9	507,07 \pm 10,7	500
San Gerónimo	ECHCl ₃	169,1 \pm 5,7	105,6 \pm 1	100
	EEtOH	159,16 \pm 1,5	103,6 \pm 2,8	100
	EAc	422,29 \pm 9,6	342,85 \pm 9,3	300
Puesto Pedernera	ECHCl ₃	94,83 \pm 1,6	45,71 \pm 0,4	50
	EEtOH	571,96 \pm 10,3	326,81 \pm 9,8	500
	EAc	573,41 \pm 2,3	491,97 \pm 0,7	600

Los valores se expresan como promedio de tres experimentos independientes \pm error estándar.

La obtención del valor de CC_{50} nos da una idea de la toxicidad de los extractos, de esta manera valores altos de CC_{50} implican baja toxicidad y valores bajos, alta toxicidad. Como se observa en la **Tabla 8**, los extractos acuosos (EAc) resultaron ser los menos tóxicos y los orgánicos (EEtOH y CHCl₃) los más citotóxicos, independientemente de la población. De manera general, entre las cuatro poblaciones evaluadas, el extracto EEtOH de Villa del Parque resulto ser el más citotóxico y el EAc de la misma población, el menos citotóxico (**Tabla 8**).

También se determinaron los valores de la concentración subtóxica (CC_{80}) obtenidos por extrapolación a partir de las curvas de viabilidad celular (**Anexo I**), los cuales fueron comparados con aquellos obtenidos mediante la observación microscópica de los ECP. Estos valores se muestran en la **Tabla 8**.

A partir de estos resultados se puede que existe una concordancia, entre lo que se observó mediante microscopia óptica (método cualitativo) y lo que se obtuvo con la utilización de un método cuantitativo.

B.1.3 Determinación del título del stock viral

Siguiendo la metodología propuesta por Earley *et al.*, 1967 se obtuvieron los títulos de los stocks para los virus utilizados en esta tesina:

- ✓ Virus Herpes Simplex Tipo I (**HSV-I**): 25×10^6 UFP/mL
- ✓ Virus Chikungunya (**CHIKV**): 3×10^8 UFP/mL

En la **Figura 13**, a modo de ilustración se muestra la imagen de la titulación obtenida para ambos virus.

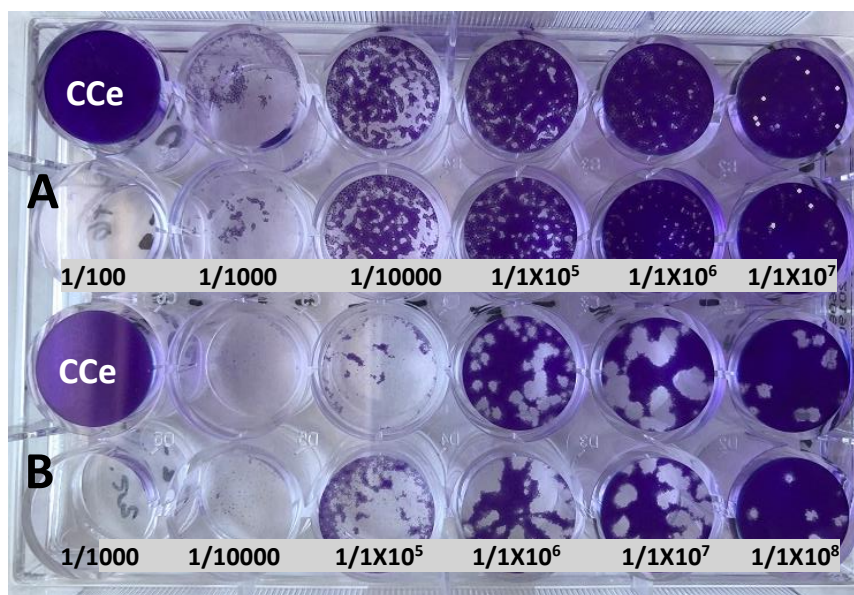


Figura 13. Titulación de **HSV-I (A)** y **CHIKV (B)** mediante la metodología de unidades formadoras de placa bajo agarosa en células Vero. La monocapa de células se tiñe con el colorante vital cristal-violeta, por lo tanto, cada punto blanco corresponde a una unidad formadora de placa (UFP), iniciada por una partícula viral. De esta manera se puede cuantificar el stock viral. CCe: Control celular. Los números corresponden a las diluciones del stock sembradas.

B.1.4 Screening actividad antiviral in vitro

Para realizar un tamizaje de la actividad de los extractos en cuanto a su capacidad de actuar sobre alguno de los modelos virales en estudio, se utilizó una metodología general que permite determinar la capacidad de los mismos para reducir el número de unidades formadoras de placas de lisis (UFP) con respecto al control viral. Los resultados de la inhibición de los extractos sobre los modelos virales se muestran en el **Anexo II**. A partir de ellos, se elaboró la **Tabla 9**, donde se muestra el porcentaje de inhibición (%I) de la mayor concentración evaluada (**CC₈₀**) de cada extracto. Porcentajes de inhibición inferiores al 50% se consideraron extractos sin actividad (-) (Konigheim, 2012).

Tabla 9. Actividad antiviral de los extractos de *B. crispera* sobre los diferentes modelos virales, a la CC₈₀. Se utilizó el método reducción de unidades formadoras de placas (UFP).

Población	Extractos	Actividad Antiviral (%I)*	
		HSV-I	CHIKV
Villa del Parque	ECHCl ₃	- **	-
	EEtOH	-	-
	EAc	-	-
Tala Cañada	ECHCl ₃	-	59,4 ± 0,6
	EEtOH	57,6 ± 0,4	-
	EAc	-	-
San Gerónimo	ECHCl ₃	-	67 ± 1,2
	EEtOH	61,6 ± 0,5	63,5 ± 0,9
	EAc	-	57,9 ± 1,1
Puesto Pedernera	ECHCl ₃	55,2 ± 0,4	81,6 ± 0,9 ^{AP}
	EEtOH	78,9 ± 0,2 ^{AP}	79 ± 0,8 ^{AP}
	EAc	51,21 ± 0,7	74,0 ± 0,6

Los valores se expresan como promedio de dos experimentos independientes ± error estándar.

* Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición respecto de los controles virales (100 %).

^A diferencias significativas dentro de una población; ^P diferencias significativas entre poblaciones

** (-) Porcentajes de inhibición < 50%.

En vista de los resultados se puede observar como la población de Puesto Pedernera (PP) presentó el mayor porcentaje de inhibición sobre ambos virus. Mientras que la población de Villa del Parque (VP) no resultó activa para ninguno y las poblaciones de Tala Cañada (TC) y San Gerónimo (SG) presentaron una actividad moderada. Concretamente, para las poblaciones de PP, TC y SG, el extracto etanólico (EEtOH) resultó ser el que mejor actúa sobre el HSV-I, mientras que, el extracto clorofórmico (ECHCl₃) resultó ser el más activo frente a CHIKV.

Una vez obtenidos los porcentajes de inhibición para cada extracto se realizaron dos análisis de la varianza. Por un lado, para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los extractos dentro de cada población y por el otro, entre poblaciones para un mismo extracto (**Anexo III A-B**).

Al realizar el primer análisis sobre los porcentajes de inhibición de cada extracto dentro de cada población sobre HSV-I, se encontró que para la población de PP el extracto EEtOH fue significativamente distinto a los otros dos extractos (DGC, gl= 5; p≤0,05), siendo

éste el más activo sobre dicho virus (78,9%). Por otro lado, al analizar los resultados sobre CHIKV, se determinó que la población de PP presenta diferencias significativas entre sus extractos (DGC, $gl=5$; $p \leq 0,05$), resultando los extractos EEtOH y ECHCl₃ estadísticamente diferentes del acuoso, con los valores más altos de inhibición (79% y 81,6%, respectivamente). Al analizar la actividad de los extractos de la población de SG sobre CHIKV no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

En el segundo análisis, los datos muestran que existen diferencias estadísticas entre las poblaciones para cada tipo de extracto evaluado (DGC, $gl=5$; $p < 0,05$), tanto sobre HSV-I como sobre CHIKV destacándose para cada extracto la población de PP como significativamente distinta ($p \leq 0,05$) y con el mayor porcentaje de inhibición sobre ambos virus.

B.1.5 Determinación de la actividad virucida

La evaluación de la actividad virucida de los extractos frente a los diferentes modelos virales, mostró que todas las poblaciones tuvieron algún grado de actividad. Sin embargo, los extractos que provocaron disminuciones de UFP ≤ 2 logaritmos con respecto al control viral, no fueron considerados para incluirlos como extractos con actividad virucida (Konigheim, 2012). La población de PP presentó la mejor capacidad virucida sobre ambos virus, siendo el extracto EEtOH el de mayor actividad. VP, TC y SG presentaron una actividad intermedia. De los extractos de VP solo el EEtOH tuvo actividad, siendo ésta exclusivamente sobre HSV-I, en el caso de TC solo el extracto EAc fue activo para ambos modelos virales. Mientras que para SG el extracto ECHCl₃ resultó poseer efecto solo sobre HSV-I y los extractos EEtOH y EAc únicamente sobre CHIKV (**Tabla 10**).

Tabla 10. Actividad virucida de los extractos de las cuatro poblaciones silvestres de *B. crista*, sobre los virus HSV-I y CHIKV.

Población	Extracto	HSV-I	CHIKV
		Nº UFP	Nº UFP
Villa del Parque	ECHCl ₃	-*	-
	EEtOH	2,05 x10 ⁴	-
	EAc	-	-
Tala Cañada	ECHCl ₃	-	-
	EEtOH	-	-
	EAc	2,20 x10 ⁴	2,55 x10 ⁵
San Gerónimo	ECHCl ₃	2,00 x10 ⁴	-
	EEtOH	-	2,50 x10 ⁵
	EAc	-	3,00 x10 ⁵
Puesto Pedernera	ECHCl ₃	2,30 x10 ⁴	2,05 x10 ⁵
	EEtOH	3,15 x10 ² ^{AP}	2,50 x10 ³ ^{AP}
	EAc	1,75 x10 ³ ^{AP}	1,95 x10 ⁵ ^P
Control Viral	Sin Extracto	2,30 x10⁷	3,00 x10⁸

Los valores se expresan como promedio de tres experimentos independientes ± desviación estándar.

^A diferencias significativas dentro de una población; ^P diferencias significativas entre poblaciones

*(-) Disminuciones ≤ 2 logaritmos

Al igual que con la actividad antiviral se realizaron dos análisis de la varianza para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los extractos dentro de cada población y entre poblaciones para un mismo extracto (**Anexo IV A-B**).

Con respecto al primer análisis sobre el virus HSV-I, mostró que existen diferencias significativas entre los extractos dentro de PP (DGC, gl=8; p≤0,05). Los extractos EEtOH y EAc de dicha población, fueron significativamente diferentes al extracto ECHCl₃, siendo los dos primeros los que mayor número de UFP redujeron. Al analizar los resultados sobre CHIKV, solo PP presentó diferencias significativas entre sus extractos (DGC, gl=8; p≤0,05), resultando el extracto EEtOH estadísticamente diferente al resto y con la mayor actividad virucida.

Por último y considerando el segundo análisis, los resultados sobre HSV-I muestran que existen diferencias significativas entre poblaciones para un mismo tipo de extracto (DGC, gl=5; p≤0,05). En el caso de los extractos EAc, se destaca como distinta y con la menor actividad virucida la población de TC. Mientras que, para los extractos EEtOH se destacó la

población de PP, con la mayor actividad virucida. No se encontraron diferencias entre las poblaciones para los extractos ECHCl₃.

Para el caso de CHIKV, los resultados obtenidos fueron similares, ya que también existen diferencias estadísticas entre todas las poblaciones para cada extracto evaluado (DGC, gl=5; p≤0,05). Siempre destacándose la población de PP como significativamente distinta y con el mayor porcentaje de inhibición sobre este virus.

A modo de síntesis de los resultados obtenidos en esta tesina se elaboró la **Tabla 11**, donde se muestran los resultados de la bioactividad de las poblaciones evaluadas y su correspondiente caracterización fenotípica.

Tabla 11. Síntesis de los resultados obtenidos en bioactividad y caracterización fenotípica de las cuatro poblaciones de *B. crista* evaluadas.

A: HSV-I; B: CHIKV;

(*): Diferencias significativas (p≤0,05)

Poblac.	Dpto.	Extract.	CC ₅₀	Actividad Antiviral		Actividad Virucida		Altura	Ancho de ala	Longitud de entrenado	Longitud de fluorescencia femenina	Nº de achenios por capitulo
				A	B	A	B					
Villa del Parque	Santa María	EEtOH	92,99 ± 3,5			+		24,7	0,15*	1,28	0,81*	53*
		ECHCl ₃	326,17 ± 6,7									
		EAc	700,42 ± 17,3									
Tala Cañada	Pocho	EEtOH	413,46 ± 19,5	+				24,9	0,25	1,32	1,02	70
		ECHCl ₃	109,27 ± 4,6		+							
		EAc	611,96 ± 9			+	+					
San Gerónimo	Pocho	EEtOH	159,16 ± 1,5	+	+		+	25,27	0,23	1,26	0,99	81*
		ECHCl ₃	169,1 ± 5,7		+	+						
		EAc	422,29 ± 9,6		+		+					
Puesto Pedernera	Punilla	EEtOH	571,96 ± 10,3	+#	+	+#	+#	20,5*	0,2	1,06	0,98*	75
		ECHCl ₃	94,83 ± 1,6	+	+#	+	+					
		EAc	573,41 ± 2,3	+	+	+#	+					

(#): Mejores efectos inhibitorios

Discusión

Según la OMS, aproximadamente el 75% de la población mundial recurre a las plantas para el cuidado de la salud sobre la base de su uso en la medicina tradicional. Reconoce así que las plantas medicinales juegan un papel importante en la atención primaria de la salud, ya que es la práctica más popular debido a su accesibilidad y asequibilidad. Las plantas medicinales están “al alcance de la mano” ya que se pueden cultivar o recolectar (accesibilidad) y son fáciles de obtener porque constituyen un bien económico (asequibilidad). En este contexto, una gran variedad de productos naturales y sus derivados son considerados como posibles candidatos para el tratamiento de enfermedades virales humanas (Huleihel & Isanu, 2002; Gekker *et al.*, 2005). Recientemente, se han informado los efectos inhibitorios de diferentes extractos de plantas medicinales en la replicación de varios virus; entre ellos HSV-I, virus de inmunodeficiencia humana (HIV), virus de la hepatitis B, virus de la Influenza A, Echovirus y el virus del síndrome respiratorio agudo severo (Mukhtar *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2017; Ogbole *et al.*, 2018).

Particularmente la Argentina, gracias a la gran diversidad de biomas que presenta por su extensa geografía en sentido norte-sur (donde crece una gran diversidad de plantas) ofrece interesantes posibilidades de encontrar nuevos compuestos antivirales de origen natural. Asteraceae es la familia de plantas más numerosa y diversa de nuestro país, y es altamente prometedora desde una perspectiva farmacológica (Giberti, 2008). Dentro de esta familia, las plantas del género *Baccharis* tienen un amplio uso en la medicina popular, lo cual ha llevado a que extractos y compuestos obtenidos de algunas de sus especies hayan sido evaluados en la búsqueda de diversas actividades biológicas (Alvarenga *et al.*, 2017). *Baccharis crispa* es una especie dentro de este grupo que, en los últimos años, ha experimentado una creciente demanda para ser utilizada debido a algunas de sus atribuciones terapéuticas (Díaz Cúneo, 2012). De esta forma, las poblaciones están siendo sometidas a una constante presión lo que podría provocar la pérdida irrecuperable de la especie (Chaves, 2012). Por tanto, ahondar en el estudio de esta especie nativa, mejorando el conocimiento de sus bioactividades y principalmente sus propiedades antivirales, podría ser de gran importancia para promover su conservación y uso sustentable. Para ello, y considerando que la calidad de un producto de origen vegetal con destino terapéutico, está definida en primera instancia por el genotipo, y posteriormente, por su interacción con el ambiente (Chaves, 2012), para esta tesina se comenzó caracterizando los ambientes de crecimiento de poblaciones silvestres de la especie en la provincia de Córdoba, (Puesto Pedernera, PP; Villa del Parque, VP; San Gerónimo, SG

y Tala Cañada, TC), determinando que estas crecen por encima de los 800 msm, con una temperatura media anual comprendida entre los 18-30°C en el mes de enero y 5-14°C en el mes de julio, y una precipitación media anual que varía entre los 120-140 mm, según el lugar. Además, se caracterizaron los suelos desde el punto de vista físico y químico a partir de la estimación de las variables edáficas de los sitios de crecimiento de las poblaciones. Estas poblaciones crecen en suelos principalmente arenosos, con pH levemente ácido y con buen drenaje. Estos resultados concuerdan con lo demostrado por Chaves (2012), al caracterizar el ambiente de crecimiento de poblaciones silvestres de la especie en la provincia de Córdoba.

Luego, se describió fenotípicamente a las cuatro poblaciones y se encontró que, para los cinco caracteres morfológicos evaluados existen diferencias significativas entre las poblaciones, destacándose la población de PP como aquella con los individuos de menor altura (20,5 cm) y longitud de entrenudo (1,06 cm); y la población de VP con los individuos con menor ancho de ala (0,15 cm), longitud de florescencia femenina (0,81 cm) y número de aquenios por capítulo (53). Es importante mencionar sobre este análisis que, en trabajos anteriores (Chaves, 2012; Chaves *et al.*, 2010), la longitud de inflorescencia femenina no permitió diferenciar las poblaciones evaluadas; éste es un carácter de índole cuantitativo con efecto ambiental sobre la expresión del fenotipo y, debido a la variación en la respuesta entre lo visto en trabajos previos (Chaves *et al.*, 2010, 2014 y Chaves, 2012) y el actual, probablemente de baja heredabilidad.

Con respecto al estudio de la variabilidad entre las poblaciones, se determinó su existencia con variables morfológicas y ambientales. Se observó que las poblaciones de PP y VP son las que presentan la mayor distancia de Biplot, lo que indica que entre estas poblaciones existe la mayor variabilidad para las variables consideradas en el análisis, PP asociada a la variable arena media y VP al contenido de materia orgánica, carbono y arena muy fina. Mientras que, las poblaciones de TC y SG aparecen altamente relacionadas entre sí y asociadas a las variables ambientales: conductividad eléctrica y contenido de arcilla; y a los caracteres morfológicos: ancho de ala, altura y longitud de entrenudo. Estos resultados se corresponden con los encontrados por Chaves *et al.* (2010, 2014) y Chaves (2012) en los cuales se determinó la variabilidad fenotípica entre poblaciones de *B. crispa* en las serranías de la provincia de Córdoba y San Luis (Argentina).

En cuanto a la evaluación de la bioactividad, primero se determinaron los valores de Concentración Citotóxica 50 (CC₅₀) para cada extracto, los cuales también confirmaron que existe variabilidad en relación a las bioactividades entre y dentro de las poblaciones evaluadas, siendo los extractos EEtOH de VP y ECHCl₃ de PP los más tóxicos, con valores ≤

100 µg/mL. Dentro del género *Baccharis* se ha reportado la presencia de tricotecenos macrocíclicos en numerosas especies, los cuales presentan alta toxicidad sobre células eucariotas (Mongelli *et al.*, 1997). Estos compuestos podrían ser los responsables de la disminución de la viabilidad celular observada por los extractos de las poblaciones de VP y PP. Por otro lado, los extractos acuosos (EAc) resultaron ser los menos tóxicos, independientemente de la población evaluada.

Con respecto a la actividad antiviral, se puede mencionar que la población de VP fue inactiva independientemente del extracto y virus evaluado. Siendo PP la población de *B. crispa* con mejor actividad inhibitoria sobre ambos virus, donde el extracto EEtOH fue el más efectivo sobre HSV-I y el ECHCl₃ sobre CHIKV. Las poblaciones de SG y TC poseen una mixtura en cuanto a sus actividades. Por un lado, en SG solo el extracto EEtOH tuvo actividad sobre HSV-I, mientras que para CHIKV todos sus extractos fueron activos. Por otro lado, la población de TC presentó un solo extracto activo para cada modelo viral evaluado; el extracto EEtOH sobre HSV-I y el ECHCl₃ sobre CHIKV, siendo el EAc totalmente inactivo. En general, los resultados obtenidos se condicen con la actividad observada por Rivarola *et al.* (2009); quienes encontraron que extractos acuosos y clorofórmicos de *B. crispa* actúan inhibiendo los virus HSV-I y el virus encefalitis equina Venezolana (VEEV). Sin embargo, en dicho estudio no se trabajó con extractos EEtOH los cuales, según este trabajo, resultaron más activos sobre HSV-I que los extractos EAc y ECHCl₃.

En la literatura se informa que algunos extractos de diferentes especies de *Baccharis* poseen actividad antiviral, entre ellos extractos acuosos y etanólicos de *B. crispa* y *Baccharis notoserquilla* inhibieron la replicación de los virus de la estomatitis vesicular (VSV) y poliovirus (PV) (Martinez *et al.*, 2005); extractos acuosos e hidroetanólicos de *B. trinervis*, *B. erioclada*, *B. megapotamica* y *B. uncinella* tuvieron actividad sobre HSV-I (Montanha *et al.*, 2004); extractos acuosos de *B. genistelloides* presentaron actividad antiviral frente a HSV-1 y VSV (Abad *et al.*, 1999); extractos acuosos y etanólicos de *B. trinervis* inhibieron al virus HIV (Palomino *et al.*, 2002); extractos acuosos de *B. articulata* inhibieron HSV-I (Torres *et al.*, 2011) y *B. dracunculifolia* presentó actividad sobre PV (Búfalo *et al.*, 2009).

Si bien, algunos de estos autores han encontrado actividad sobre el HSV-I, la metodología utilizada para la evaluación de la actividad es completamente diferente. Ya que ellos miden la disminución de la replicación viral mediante la observación microscópica de la reducción de los efectos citopáticos producidos por el virus al infectar las células, es decir mediante un método cualitativo. Por otro lado, Montanha *et al.* (2004), al evaluar la capacidad

de los extractos no son capaces de diferenciar si la disminución observada se debe a un efecto virucida o antiviral.

Si se analiza la actividad antiviral por virus, en general los extractos EEtOH resultaron ser más efectivos (con valores de inhibición más altos) sobre el HSV-I, mientras que los ECHCl₃ lo fueron sobre CHIKV. Estos resultados, podrían indicar que los extractos probablemente posean perfiles químicos diferentes, lo cual les confiere capacidad de actuar de manera diferencial.

Aunque no fue objetivo de este trabajo determinar los compuestos bioactivos de los extractos, hasta el momento son pocos los compuestos aislados del género que reportaron actividad antiviral, entre ellos baccharinoides y saratoxinas (tricotecenos macrocíclicos aislados de *B. coridifolia*) con actividad antiviral contra HSV-II (Okazaki *et al.*, 1989), ácidos dicafeoilquínicos (aislados de *B. genistelloides*) sobre HIV (Robinson *et al.*, 1996) y bacrispina (diterpeno, aislado de *B. crispa*) con actividad sobre HSV-I y el virus Junín (Aguilar *et al.*, 2008).

Con lo que respecta a la actividad virucida, en general todos los extractos fueron activos. Sin embargo, al considerar solo aquellos que fueron capaces de inhibir en más de dos logaritmos en comparación con los controles, fueron activos sobre HSV-I todos los extractos de PP, el EEtOH de VP, el EAc de TC y el ECHCl₃ de SG. En tanto que, sobre CHIKV tuvieron actividad los extractos, EEtOH y EAc de SG, EAc de TC y nuevamente todos los extractos de la población de PP. De esta manera, PP resultó ser la población más activa, destacándose la actividad el extracto EEtOH sobre ambos modelos virales. Estos resultados son alentadores ya que, no solo son inéditos para esta especie sino también aportan al conocimiento de las bioactividades del género, reforzando datos previos obtenidos con resultados poco alentadores acerca de esta actividad sobre HSV-I en la especie *B. gaudichaudiana* (Visintini Jaime, 2014) y resultados contundentes de extractos de *B. articulata* sobre el mismo virus (Torres *et al.*, 2011)

La variabilidad en la bioactividad entre las poblaciones se condice con la variabilidad encontrada a nivel fenotípico, destacando a las poblaciones de PP y VP como aquellas con las actividades biológicas y características ambientales más diferentes. En cuanto a las poblaciones de TC y SG, tanto en bioactividad como variabilidad, podría decirse que se caracterizaron por poseer actividades intermedias y variables morfológicas y ambientales similares.

Por último, es importante destacar que los resultados obtenidos en relación a la actividad antiviral sobre el virus Chikungunya (CHIKV) son inéditos; ya que no existen hasta

el momento antecedentes acerca de la actividad antiviral de este género sobre dicho virus. Lo cual, resulta de gran interés principalmente para nuestro país, donde este virus junto con los virus Dengue y Zika están descriptos como virus en circulación en el territorio argentino y con el riesgo de futuros brotes por la presencia del vector en una extensa zona geográfica del país (OMS, 2017). Asimismo, vale la pena destacar que son escasos los antecedentes sobre algún producto natural con actividad sobre CHIKV. Hasta el momento, andrografolidos (labdanos diterpenoides obtenidos de la especie vegetal *Andrographis paniculata*) y berberina (alcaloide aislado de plantas del género *Berberis*) han demostrado poseer actividad inhibitoria sobre CHIKV (Wintachai *et al.*, 2015; Varghese *et al.*, 2016).

De esta manera, los resultados obtenidos en esta tesina no solo amplían y profundizan las actividades antivirales descriptas dentro del género, si no también son un gran aporte al estudio de la especie, ya que los únicos antecedentes sobre la capacidad antiviral de la misma son los de Martinez *et al.*, (2005); Aguilar *et al.*, (2008) y Rivarola *et al.*, (2009).

Conclusión

A partir de los resultados obtenidos en el análisis de variabilidad y el *screening* de actividad antiviral de cuatro poblaciones silvestres de *B. crispa* de la provincia de Córdoba, se concluye que existe variabilidad fenotípica y bioactividad diferencial entre las poblaciones silvestres evaluadas, particularmente entre las poblaciones Villa del Parque y Puesto Pedernera. Esta última población resultó ser la más activa, tanto en su actividad antiviral como virucida, destacándose el extracto etanólico (EEtOH) como poco tóxico y con la mejor actividad inhibitoria frente a ambos modelos virales. Villa del Parque, por otro lado, fue en general inactiva independientemente del extracto y virus evaluado. Resulta entonces promisorio seleccionar la población de Puesto Pedernera y continuar su estudio orientado al fraccionamiento bioguiado para el aislamiento e identificación de el/los compuesto/s activo/s y el estudio del mecanismo de acción antiviral frente a ambos virus.

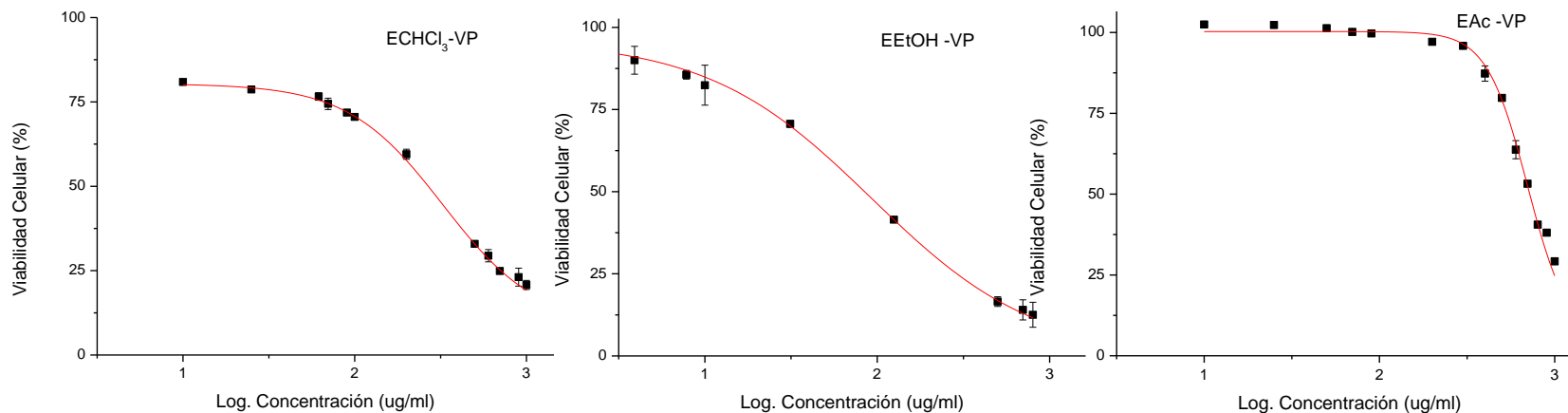
Finalmente, este trabajo sienta las bases para continuar con el estudio exhaustivo sobre las propiedades antivirales de la especie *B. crispa*, profundiza los antecedentes de bioactividad ya reportados sobre el género y la especie, aportando datos inéditos sobre la actividad antiviral de la misma, siendo el primer registro de bioactividades de poblaciones silvestres *B. crispa* de la provincia de Córdoba y reforzando los resultados de la existencia de variabilidad a nivel fenotípico demostrados por Chaves (2012). Además, los resultados obtenidos en esta tesina contribuyen al conocimiento de la especie para promover su conservación y uso sostenible.

Proyecciones

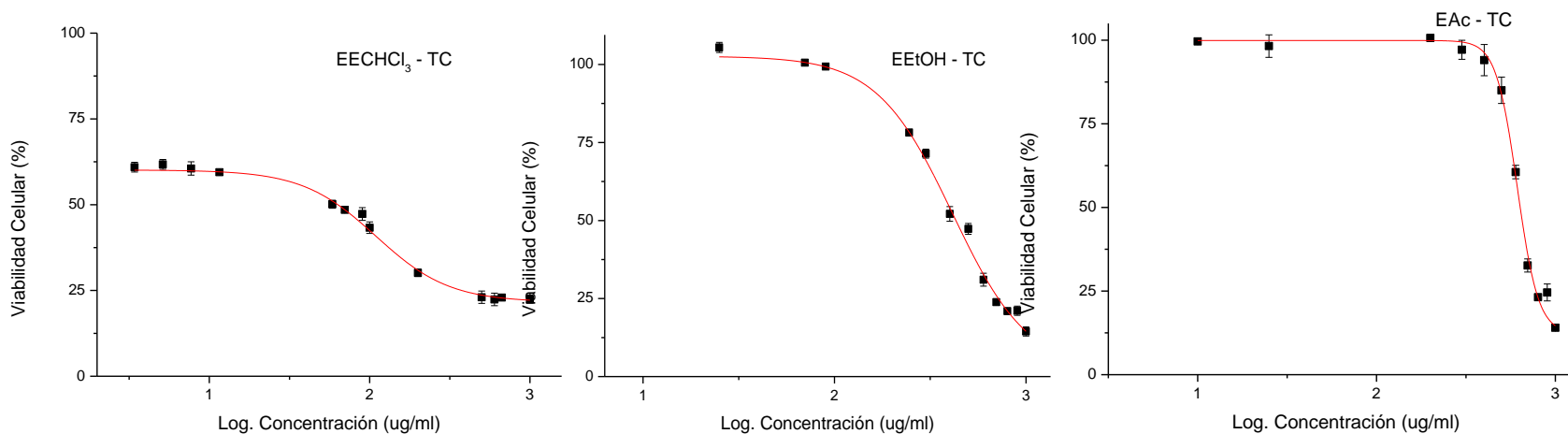
- ✓ Evaluar si los extractos de *B.crispa* que resultaron activos, también tienen actividad inhibitoria sobre otros virus de importancia sanitaria: Virus Dengue (DENV), Virus Encefalitis de Sant Louis (ESLV), entre otros.
- ✓ Avanzar en los estudios químicos sobre las poblaciones evaluadas para poder determinar cuál/cúales son los metabolitos responsables de las bioactividades diferenciales.
- ✓ Dado que los tricotecenos macrocíclicos han sido descritos como los responsables de las actividades antivirales observadas sobre Herpes Simplex tipo II (HSV-II), evaluar si estos están presentes dentro de la especie *B.crispa*.
- ✓ En vista que la población de Puesto Pedernera resultó ser promisoría por su potencial capacidad antiviral, obtener líneas clonales bioactivas a partir de la misma que puedan multiplicarse y asegurar una calidad estable en los productos de origen natural.

Anexo I- Curvas dosis respuesta (porcentaje de viabilidad celular vs. Log. concentración) de los extractos Etanólicos, Clorofórmicos y Acuosos para las cuatro poblaciones. El análisis regresión lineal para todas las curvas dio un valor de ($R^2 > 0,9$). Las barras representan el error estándar obtenida a partir de tres experimentos independientes.

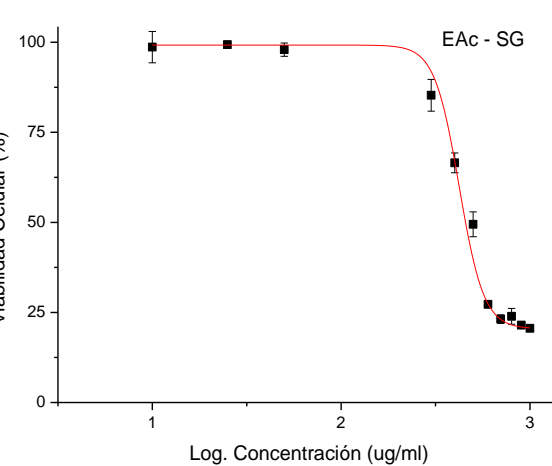
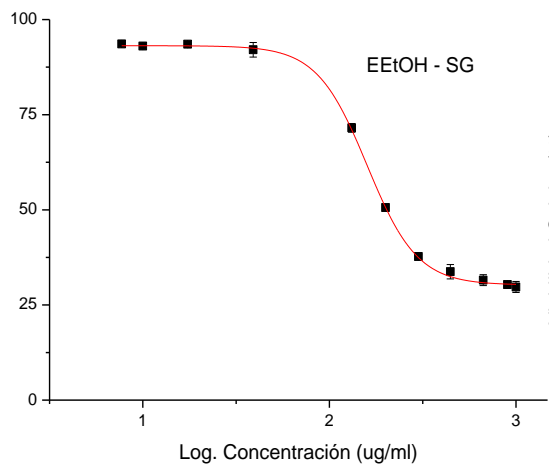
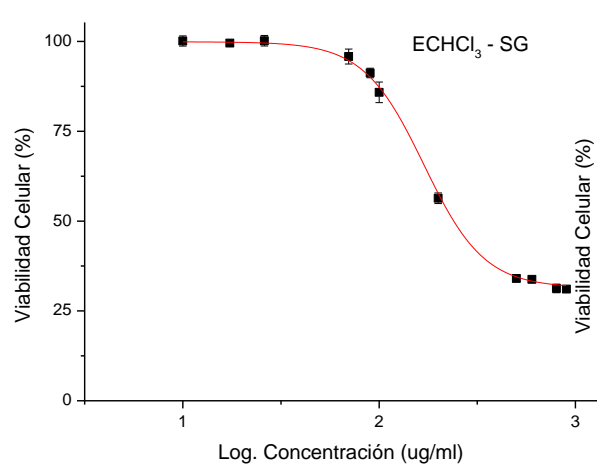
Población de Villa del Parque



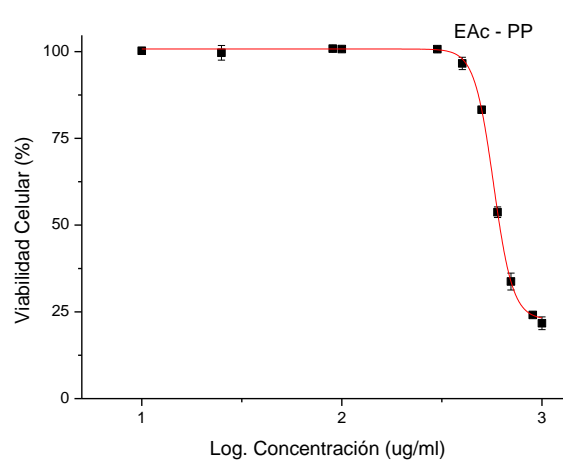
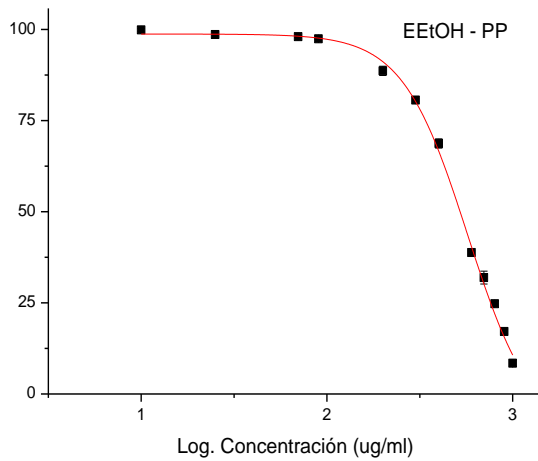
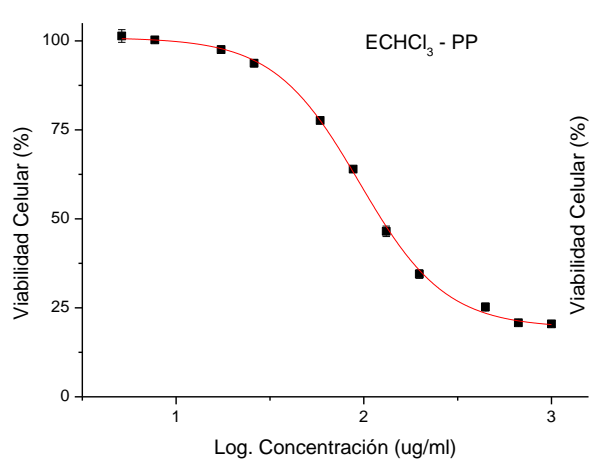
Población de Tala Cañada



Población de San Gerónimo

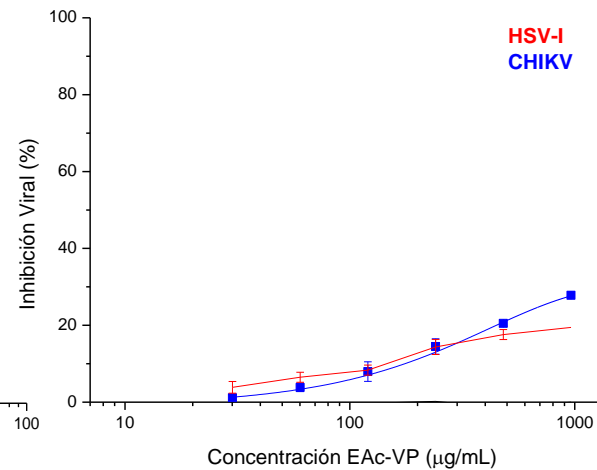
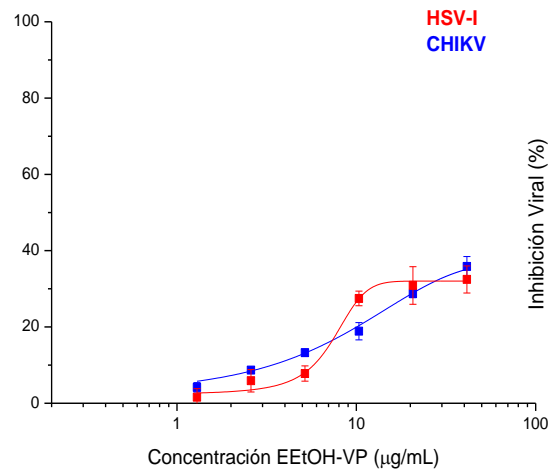
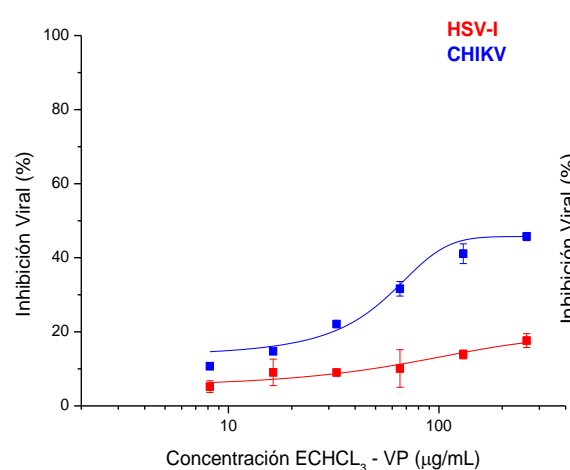


Población de Puesto Pedrera

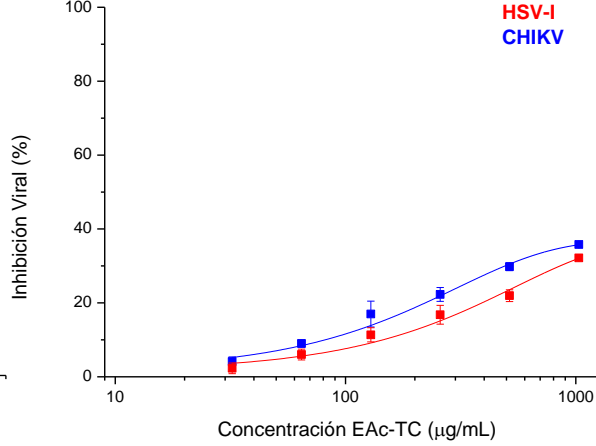
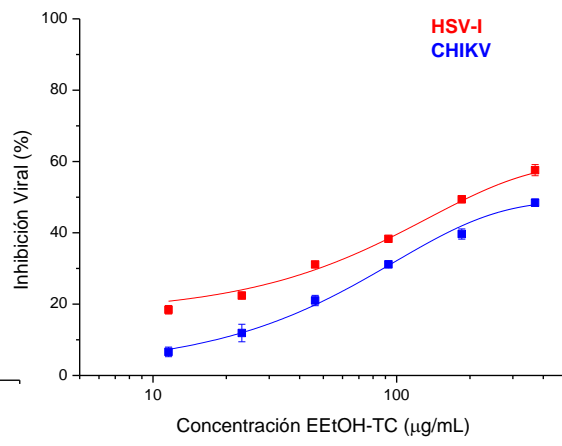
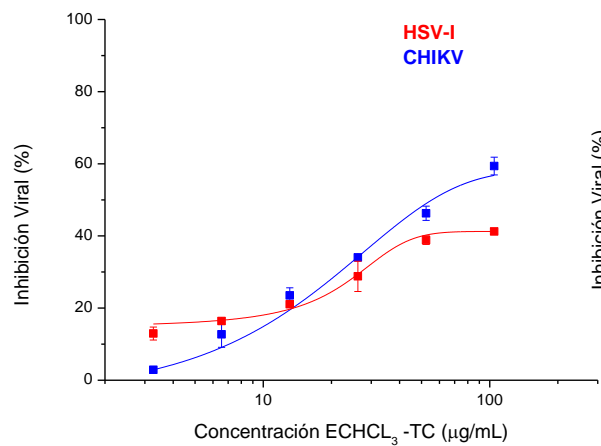


Anexo II - Curvas dosis respuesta del Porcentaje de Inhibición vs. Concentración ($\mu\text{g/mL}$) de los extractos etanólicos, clorofórmicos y acuosos de las cuatro poblaciones de *B.crispa*. Las barras representan el error estándar, obtenida a partir de tres experimentos independientes.

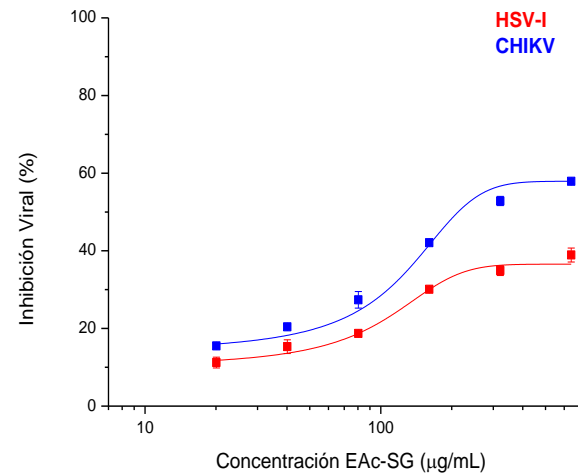
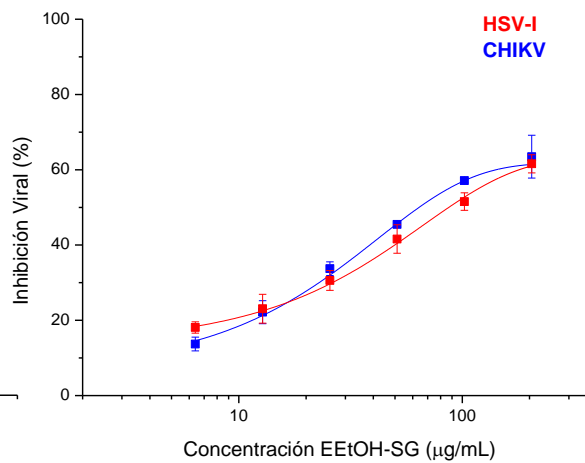
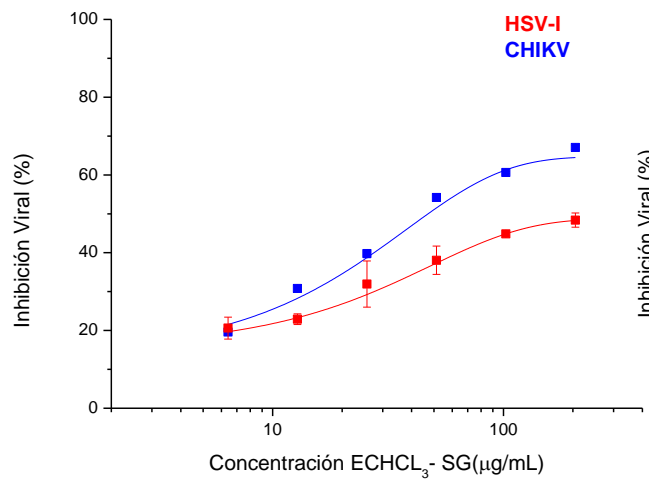
Población de Villa del Parque



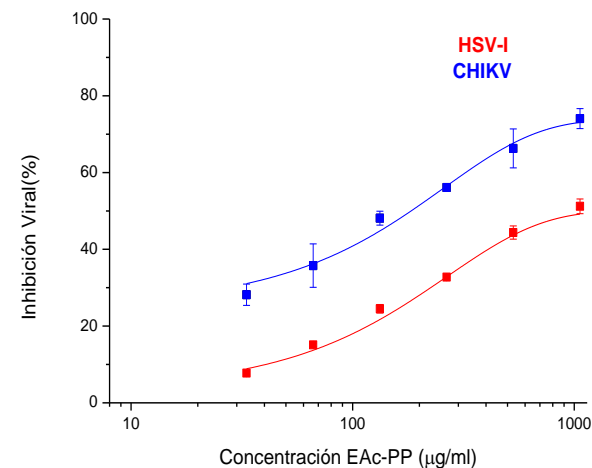
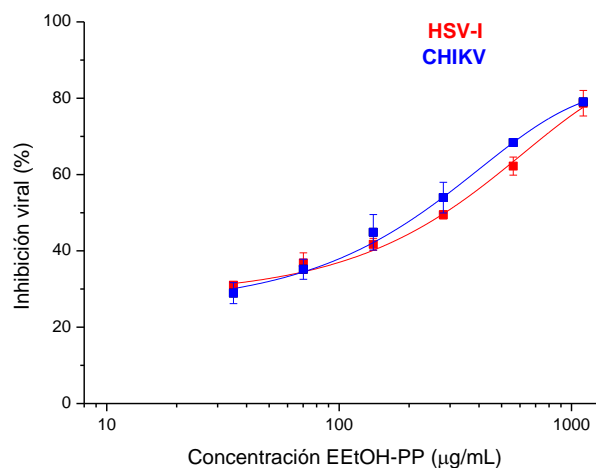
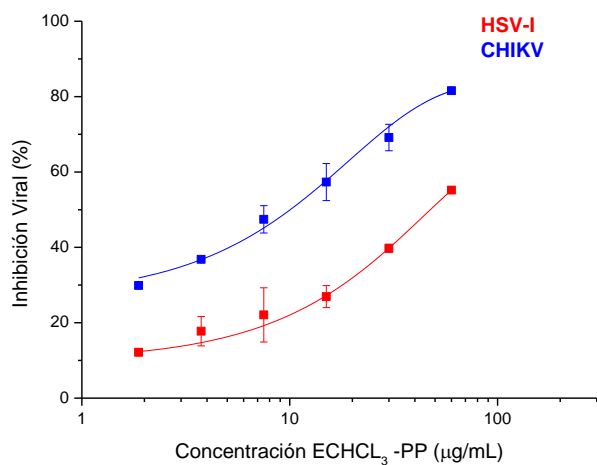
Población de Tala Cañada



Población de San Gerónimo



Población de Puesto Pedrera



Anexo III - Tabla resumen del análisis estadístico de la actividad antiviral de cada extracto sobre HSV-I (A) y CHIKV (B), dentro y entre cada población, utilizando el test a posteriori DGC con un α de 0,05. Letras diferentes indican diferencias significativas.

(A)

Población	Clorofórmico	Etanólico	Acuoso
PP	52,2% (B)	78,9% (A)	51,21 (B)
Extracto	TC	SG	PP
Etanólico	57,6% (B)	61,6% (B)	78,9% (A)

(B)

Población	Clorofórmico	Etanólico	Acuoso
SG	67% (A)	63,5% (A)	57,9% (A)
PP	81,6% (A)	79% (B)	74% (B)
Extracto	SG	TC	PP
Clorofórmico	67% (B)	59,4% (C)	81,6% (A)
Etanólico		63,5% (A)	79% (B)

Anexo IV- Tabla resumen del análisis estadístico de la actividad virucida de cada extracto sobre HSV-I (A) y CHIKV (B), dentro y entre cada población, utilizando el test a posteriori DGC con un α de 0,05. Letras diferentes indican diferencias significativas.

(A)

Población	Clorofórmico	Etanólico	Acuoso	
PP	$2,30 \times 10^4$ (A)	$3,15 \times 10^2$ (B)	$1,75 \times 10^3$ (B)	
Extracto	VP	TC	SG	PP
Etanólico	$2,05 \times 10^4$ (A)			$3,15 \times 10^2$ (B)
Acuoso		$2,20 \times 10^4$ (A)		$1,75 \times 10^3$ (B)
Clorofórmico			$2,00 \times 10^4$ (A)	$2,30 \times 10^4$ (A)

(B)

Población	Clorofórmico	Etanólico	Acuoso
SG		$2,50 \times 10^5$ (A)	$3,00 \times 10^5$ (A)
PP	$2,05 \times 10^5$ (A)	$2,50 \times 10^3$ (B)	$1,95 \times 10^5$ (A)
Extracto	SG	TC	PP
Etanólico	$2,50 \times 10^5$ (A)		$2,50 \times 10^3$ (B)
Acuoso	$3,00 \times 10^5$ (A)	$2,55 \times 10^5$ (B)	$1,95 \times 10^5$ (C)

Bibliografía

- Abad, M.J. & Bermejo, P. (2007). *Baccharis* (Compositae): a review update. *Arkivoc*, 7(7), 76-96.
- Abad, M.J., Bermejo, P., Gonzales, E., Iglesias, I., Irurzun, A. & Carrasco, L. (1999). Antiviral activity of Bolivian plant extracts. *General Pharmacology: The Vascular System*, 32(4), 499-503.
- Aguilar, J.J., Konigheim, B.S., Tonn, C. & Contigiani, M.S. (2008) Actividad antiviral in vitro de Bacrispina (diterpeno) aislada de *Baccharis crispa* Spreng. *3^{er} Workshop Argentino de Química Medicinal*. Córdoba, Argentina.
- Alvarenga, N., Burgos, C., Villalba, I., Giménez, V., Carpinelli, M. M., Sotelo, P., & Langjahr, P. (2017). Extractos vegetales de tres especies del género *Baccharis* inducen la proliferación de células mononucleares humanas. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 16(2).
- Antonelli, G. & Turriziani, O. (2012). Antiviral therapy: old and current Issues. *International journal of antimicrobial agents*, 40(2), 95-102.
- Ariza Espinar, L. (1973). Las especies de *Baccharis* (Compositae) de Argentina Central. *Boletín Academia Nacional de Ciencias Córdoba*, 50(1-4), 175-305.
- Ariza Espinar, L. (2005). *Pródromo de la flora fanerogámica de Argentina central. Familia Asteraceae Tribu Asterae*. Museo Botánico. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.
- Bachmeier, O.A, Buffa, E.V., Hang, S.B. & Rollán, A.A. (2018). *Temas de edafología*. Córdoba, Argentina: SIMA.
- Borenfreund, E. & Puerner, J.A. (1985). Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology letters*, 24 (2-3), 119-124.
- Búfalo, M.C., Figueiredo, A.S., De Sousa, J.P.B., Candeias, J.M.G., Bastos, J.K. & Sforcin, J.M. (2009). Anti-poliovirus activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis by cell viability determination and real-time PCR. *Journal of applied microbiology*, 107(5), 1669-1680.

- Cantero, J.J., Nuñez, C.O., Barboza, G.E. & Ariza Espinar, L. (2006). *Flora Medicinal de la Provincia de Córdoba (Argentina). Pteridófitas y Antófitas silvestres o naturalizadas*. Córdoba, Argentina: Gráficamente, Córdoba, Argentina.
- Castilla, V., Ramírez, J. & Coto, C.E. (2009). Prospectiva del uso de esteroides de plantas como antivirales. *Química Viva*, 8(1).
- Ceñal, J.P., Giordano, O.S., Rossomando, P.C. & Tonn, C.E. (1997). Neoclerodane diterpenes from *Baccharis crispa*. *Journal of Natural Products*, 60 (5), 490-492.
- Chaves, A.G. (2012). “*Bases para la domesticación y generación de una población mejorada de la especie medicinal nativa Baccharis crispa Spreng*” (tesis de maestría). Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.
- Chaves, A.G., Torres, L.E., Massuh, Y., Brunetti, P., Ocaño, S.F., Castillo, N.E., Bustos, J.A. & Ojeda, M.S. (2010). Phenotypic variability of four wild populations of *Baccharis crispa* Spreng. Mountains area of the Province of Córdoba, Argentina. *Molecular Medicinal Chemistry*, 21, 8-10.
- Chaves, A.G., Brunetti, P.C., Massuh, Y., Ocaño, S.F., Torres, L.E. & Ojeda, M.S. (2014). Variabilidad entre poblaciones silvestres de *Baccharis crispa* Spreng. de la provincia de Córdoba, Argentina. *Phyton*, 83 (1), 145-153.
- Clardy, J. & Walsh, C. (2004). Lessons from natural molecules. *Nature*, 432 (7019), 829–837.
- Díaz Cúneo, C. (2012). *Baccharis trimera (Less.) DC. y Baccharis crispa Spreng. especies de carquejas utilizadas con fines medicinales, caracterización y análisis genéticos de poblaciones de Lavalleja, Uruguay* (tesis doctoral). Facultad de Agronomía, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.
- Del Barrio, G. & Parra, F. (2000). Evaluation of the antiviral activity of an aqueous extract from *Phyllanthus orbicularis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 72(1-2), 317-322.
- Del Barrio Alonso, G., Álvarez Rodríguez, Á.L., Valdés García, S.M. & Parra Fernández, F. (2008). Metodología de pesquisa preclínica de actividad anti-herpesvirus a partir de productos naturales. *Revista Cubana de Farmacia*, 42(2), 10-13.

Del Vitto, L.A., Petenatti, E.M. & Petenatti, M.E. (1997). Recursos Herbolarios de San Luis (República Argentina) Primera Parte: Plantas Nativas. *Multequina*, (6), 49-66.

Del Vitto, L.A., Petenatti, E.M. & Petenatti, M.E. (2002). Introducción a la Herboristería. *Serie Técnica Herbario UNSL*, 10, 10-61.

Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M. & Robledo, C.W. (2018). Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

Earley, E., Peralta, P. H. & Johnson, K.M. (1967). A plaque neutralization method for arboviruses. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 125(3), 741-747.

Farmacopea Nacional Argentina (1978). *VI ed. Codex Medicamentarius*. Buenos Aires, Argentina.

Fernandes, M.J.B., Limas, C., Rossi, M.H., Gonçalves, E. & Simoni, I.C. (2005). Cytotoxicity of subfractions and compounds from *Polymnia sonchifolia*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36(4), 338-341.

Fernández Romero, J.A., Del Barrio Alonso, G., Romeu Alvarez, B., Gutierrez, Y., Valdés, V.S. & Parra, F. (2003). In vitro antiviral activity of *Phyllanthus orbicularis* extracts against herpes simplex virus type 1. *Phytotherapy Research*, 17(8), 980-982.

García Villalón, M.D. (2002). *Inhibidores de la multiplicación del virus de la peste porcina africana* (tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.

Gekker, G., Hu, S., Spivak, M., Lokensgard, J.R. & Peterson, P.K. (2005). Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4+ lymphocyte and microglial cell cultures. *Journal of Ethnopharmacology*, 102(2), 158–163.

Gianello, J.C. & Giordano, O.S. (1984). Chemical examination of six species of Baccharis. *Reista Latinoamericana de Quimica*, 15 (2), 84-86.

Giberti, G.C. (2008). Ethnobotanical data and herbarium information from Argentina: Tools for medicinal plant research. En Martino, V. & Muschietti, L.V. *South American Medicinal Plants as a Potential Source of Bioactive Compounds*. Trivandrum, Kerala: Transworld Research Network.

- Giuliano, D.A. (2000). *Asteraceae, Tribu III, Astereae, parte A, Subtribu c. Baccharinae*. Flora Fanerogámica Argentina. *Proflora* (CONICET).6, 3-73.
- Giuliano, D.A. & Ariza Espinar, L. (1999). *Asteraceae, Tribu Astereae, Subtribu Baccharinae*. Catálogo de las plantas vasculares de la Argentina. *Missouri Botanical Garden*, 74, 125-127.
- Huleihel, M. & Isanu, V. (2002) Anti-herpes simplex virus effect of an aqueous extract of propolis. *The Israel Medical Association Journal*, 4(11 Suppl), 923-927.
- Jaime, M.F, Redko, F., Muschietti, L.V., Campos, R.H., Martino, V.S. & Cavallaro, L.V. (2013). In vitro antiviral activity of plant extracts from *Asteraceae* medicinal plants. *Virology Journal*, 10(1), 245.
- Jaramillo, S. & Baena, M. (2000). *Material de Apoyo a la Capacitación en Conservación Ex Situ de Recursos Filogenéticos*. Cali, Colombia: Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI).
- Kitazato, K., Wang, Y. & Kobayashi, N. (2007). Viral infectious disease and natural products with antiviral activity. *Drug Discovery Therapy*, 1(1), 14-22.
- Konigheim, B.S. (2012). *Prospección de productos naturales con potencial actividad antiviral obtenidos a partir de especies nativas de género Larrea* (tesis doctoral). Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.
- Lago, J., Romoff, P., Fávero, O., Souza, F., Soares, M., Baraldi, P. & Corrêa, A. (2008). Chemical composition of male and female *Baccharis trimera* (Less.) DC. (*Asteraceae*) essentials oils. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36, (733-740).
- Mangiaterra, P. (2005). *Evaluación de parámetros botánicos y fitoquímicos para el control de calidad de "Carqueja"* (tesina). Facultad de ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Belgrano. Buenos Aires, Argentina.
- Martinez, M.J.A., Bessa, A.L., & Benito, P.B. (2005). Biologically active substances from the genus *Baccharis* L. (Compositae). *Studies in Natural Products Chemistry*, 30, 703-759.
- Martínez, G.J., Planchuelo, A.M., Fuentes, E. & Ojeda, M. (2006). A numeric index to establish conservation priorities for medicinal plants in the Paravachasca Valley, Córdoba, Argentina. *Biodiversity Conservation*, 15, 2458-2475.

- Mongelli, E., Desmarchelier, C., Talou, J.R., Coussio, J. & Ciccía, G. (1997). In vitro antioxidant and cytotoxic activity of extracts of *Baccharis coridifolia* DC. *Journal of Ethnopharmacology*, 58(3), 157-163.
- Montanha, J.A., Moellerke, P., Bordignon, S.A., Schenkel, E.P. & Roehé, P.M. (2004). Antiviral activity of Brazilian plant extracts. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 23(2), 183-186.
- Müller, J. (2006). Systematic of *Baccharis* (Compositae-Asterae) in Bolivia, including an overview of the genus. *Systematic Botany Monographs*, 76, 1-341.
- Mukhtar, M., Arshad, M., Ahmad, M., Pomerantz, R.J., Wigdahl, B. & Parveen, Z. (2008). Antiviral potentials of medicinal plants. *Virus Research*, 131(2), 111–120.
- Nuñez, C. & Cantero J.J. (2000). *Las Plantas Medicinales del Sur de la Provincia de Córdoba*. Río Cuarto, Córdoba: Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto.
- Ogbole, O.O., Akinleye, T.E., Segun, P.A., Faleye, T.C. & Adeniji, A.J. (2018). In vitro antiviral activity of twenty-seven medicinal plant extracts from Southwest Nigeria against three serotypes of echoviruses. *Virology journal*, 15(1), 110.
- Okazaki, K., Yoshizawa, T., & Kimura, S. (1989). Antiviral activity of macrocyclic trichothecene mycotoxins and related compounds baccharinoids B-4 and B-5 against herpes simplex virus type 2. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(5), 1441-1443.
- OMS, WHO/CDS/CSR (2000). *A framework for global outbreak alert and response*. World Health Organization. Department of Communicable Disease, Surveillance and Response. Recuperado de: <http://www.who.int/emc>. Febrero, 2019.
- OMS (2017). *Situación en las Américas*. Recuperado de: https://www.paho.org/salud-en-las-americas-2017/?post_t es=argentina&lang=es. Marzo, 2019.
- Ooi, L.S., Wang, H., Luk, C.W. & Ooi, V.E. (2004). Anticancer and antiviral activities of *Youngia japonica* (L.) DC (Asteraceae, Compositae). *Journal of Ethnopharmacology*, 94 (1), 117-122.
- Palomino, S.S., Abad, M.J., Bedoya, L.M., García, J., Gonzales, E., Chiriboga, X., Bermejo, P. & Alcami, J. (2002). Screening of South American plants against human immunodeficiency virus: preliminary fractionation of aqueous extract from *Baccharis trinervis*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25(9), 1147–1150.

- Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M. & Ignacimuthu, S. (2006). In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary Alternative Medicine*, 6 (1), 6-39.
- Ratera, E.L. & Ratera, M.O. (1980). *Plantas de la flora argentina empleadas en medicina popular*. Buenos Aires, Argentina: Hemisferio Sur.
- Repetto, M. (2002). *Toxicología Fundamental: Métodos alternativos, Toxicidad in vitro*. Sevilla, España: Ediciones Díaz de Santos y Enpses-Mercie Group.
- Repetto, G., El Peso, A. & Zurita, J.L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*, 3 (7), 1125.
- Riva, M. & López, D. (1993). Utilización de las pruebas de citotoxicidad *in vitro* en la valoración de los efectos de los contaminantes ambientales. *Boletín del Instituto de Investigación Textil y de Cooperación Industrial*, 104, 59-64.
- Rivarola, M.E, Boris, A.S., Chaves, G., Konigheim, B., Aguilar, J.J. & Contigiani, M. (2009). Evaluación de la actividad antiviral de *Baccharis crispa* Spreng. *XI Jornadas Anuales de la Sociedad Argentina de Biología*. Buenos Aires, Argentina.
- Robinson, W.E., Reinecke, M.G., Abdel-Malek, S., Jia, Q. & Chow, S.A. (1996). Inhibitors of HIV-1 replication that inhibit HIV integrase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(13), 6326-6331.
- Salvidia, M. & Bandoni, A.L. (1987). Plantas medicinales: antecedentes para su normalización en Argentina. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 6(3), 195-206.
- Shi, Y., Zhang, B., Lu, Y., Qian, C., Feng, Y., Fang, L. & Cheng, D. (2017). Antiviral activity of phenanthrenes from the medicinal plant *Bletilla striata* against influenza A virus. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 273.
- Tagboto, S. & Townson, S. (2001). Antiparasitic properties of medicinal plants and other naturally occurring products. *Advances in Parasitology*, 50, 199–295.
- Torres, C.V., Domínguez, M.J., Carbonari, J.L., Sabini, M.C., Sabini, L.I. & Zanon, S.M. (2011). Study of antiviral and virucidal activities of aqueous extract of *Baccharis articulata* against Herpes suis virus. *Natural Product Communications*, 6(7), 993-994.

- Tonn, C.E. & Giordano, O.S. (1980). A new furane diterpenoid from *Baccharis crispa* Spreng. *Anales de la Asociación Química Argentina*, 68, (5-6), 237-241.
- Tonn, C.E., Gianello, J.C. & Giordano, O.S. (1979). BACRISPINA, a new diterpene, isolated from *Baccharis-crispa* Spreng. *Anales de la Asociación Química Argentina*, 67 (1), 1-8.
- Varghese, F.S., Thaa, B., Amrun, S.N., Simarmata, D., Rausalu, K., Nyman, T.A., Merits, A., McInerney, G.M., Ng, L.F. & Ahola, T. (2016). The antiviral alkaloid berberine reduces chikungunya virus-induced mitogen-activated protein kinase signaling. *Journal of Virology*, 90(21), 9743-9757.
- Verdi, L., Costa, I. & Pizzolatti, M. (2005). Género *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, económicos e biológicos. *Química Nova*, 28, 85-94.
- Villar del Fresno, A.M. (Ed.). (1999). *Farmacognosia general*. Madrid, España: Editorial Síntesis S.A.
- Visintini Jaime, M.F. (2014). *Actividad antiviral de plantas medicinales argentinas de la familia Asteraceae: identificación de compuestos bioactivos y caracterización del mecanismo de acción* (tesis doctoral). Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.
- Wilson, M.G (Ed.). (2017). *Manual de indicadores de calidad del suelo para las ecoregiones de Argentina*. Entre Ríos, Argentina: Ediciones INTA.
- Wintachai, P., Kaur, P., Lee, R.C.H., Ramphan, S., Kuadkitkan, A., Wikan, N., Ubol, S., Roytrakul, S., Chu J.J. & Smith, D.R. (2015). Activity of andrographolide against chikungunya virus infection. *Scientific Reports*, 5, 140-179.
- Yang, C.M., Cheng, H.Y., Lin, T.C., Chiang, L.C. & Lin, C. C. (2005). Acetone, ethanol and methanol extracts of *Phyllanthus urinaria* inhibit HSV-2 infection *in vitro*. *Antiviral Research*, 67(1), 24-30.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Córdoba, libre y gratuita, que me abrió las puertas para estudiar dos carreras de grado y brindarme un espacio para mi desarrollo profesional. Al InViV y la Facultad de Agronomía, por haberme brindado un lugar donde realizar la tesina.

A mis directoras, Brenda Konigheim y Guadalupe Chaves por su apoyo, sus consejos, por los momentos compartidos y por estar siempre ahí.

A toda la gente del Instituto de Virología (personal, becarios, doctores...) con los que he tenido la suerte de cruzarme en este camino y en particular a Javier (Aguilar), que siempre ha estado dispuesto a resolvernos todas las dudas que nos surgían (¡que paciencia has tenido!). Y no me olvido de toda esa gente extraordinaria: Lore, Romi, Pame, Flor, Guille, Eli, Marta... y tantos otros.

A los miembros del tribunal evaluador por sus comentarios y correcciones, con los que se mejoró este trabajo.

A los que más tengo que agradecer, es sin lugar a dudas a mi familia. A mis padres, por apoyarme y darme todas las herramientas para que haya podido llegar hasta aquí, pero sobre todo por quererme (y aguantarme) y hacerme la persona que soy hoy. A mis tíos y a mis abuelos (los que están y los que ya no, pero lo hacen desde otras maneras), los quiero.

A mis amigas, las de siempre con quienes comparto mis raíces, y a las que fui “colectando” en ambas carreras (Flor, Guada, Lu, Paz y Anto), sin ellas nada hubiera sido tan hermoso ni simple. También a todos los compañeros con los que me crucé, me llevo de ellos recuerdos de risas, muchos mates y apuntes compartidos.

A Leticia y Rocío, mis dos grandes guías, por su apoyo, escucha e incondicionalidad.

